



# **A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes***

**Ana Carla Matos da Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientadora: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

## **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do  
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa  
Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa  
Doutora Maria Margarida Cabrita Xavier Delgado, Investigadora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa, 2010

**No presente trabalho incluem-se os resultados das seguintes publicações:**

Neves, E., **Silva, A. C.**, Louro, P., Ferreira-Dias, S., Brito, L. (2010) The effect of chilling and freezing temperatures on the virulence of *Listeria monocytogenes* with different origins. *ISOPOL XVII: 17th International Symposium on Problems of Listeriosis*, Alfândega Congress Centre, Porto, Portugal, May 5-8 th.

Neves, E., **Silva, A. C.**, Martins, A. P. L., Brito, L. (2010). Non-growing *Listeria monocytogenes* strains submitted to cold storage presented reduced virulence in human epithelial cells (submetido para publicação).

## Agradecimentos

Quero, uma vez mais, agradecer a todos que, por um motivo ou por outro, passaram pelo laboratório de microbiologia do ISA. É um local onde há um verdadeiro espírito de equipa, onde todos estão dispostos a aprender uns com os outros e o mais importante de tudo, é que conseguimos transportar esse espírito para a nossa vida pessoal e, é frequente os colegas de trabalho, tornarem-se amigos.

Começo pelos professores, quero agradecer todo o apoio recebido do Prof. Virgílio, Prof. Manuel, Prof<sup>a</sup> Adília, Prof<sup>a</sup> Elisa, Prof<sup>a</sup> Adélia e Prof<sup>a</sup> Mané, passando para as colegas; Helena, Manuela e Isabel (qualquer uma delas sempre disponível para ajudar em tudo o que for preciso).

No que diz respeito ao resto do pessoal (estagiários / bolseiros) que passaram ou ainda estão no laboratório; Catarina Prista, André Barata, António Lourenço, Mara Pereira, Alexandra Carreira, Paula Cunha, Rute Coutinho, Catarina Fonseca e a tudo o pessoal da fisiologia pelo seu empenho, profissionalismo, camaradagem e amizade.

Ao professor Pedro Louro pela ajuda que me deu na área do tratamento dos dados.

Ao meu pai que sempre me apoiou incondicionalmente em todas as decisões que tomei na vida.

À minha mana por estar cada vez mais presente.

Ao meu pedacinho (Carolina) pela força que me dá para lutar em tudo aquilo que acredito.

Ao Zé, à Sílvia e ao Filipe por serem quem são.

Um agradecimento muito especial à minha orientadora, Professora Luísa Brito e à nossa nova Doutora Elsa Neves por toda a paciência que tiveram comigo e pela amizade.

E finalmente também, à D. Angelina, pela tolerância e simpatia em todo este processo.

Muito obrigado a todos!

## RESUMO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica de origem alimentar capaz de se multiplicar às temperaturas de refrigeração. Neste trabalho, com o objectivo de avaliar o efeito da refrigeração na virulência desta bactéria, em condições de ausência de crescimento, foi estudado o efeito do tempo de armazenagem a 7 °C (0, 1, 7 e 30 dias) em 17 isolados e duas estirpes de referência para a virulência. Os isolados, de diferentes origens, foram caracterizados por PFGE e a sua patogenicidade foi avaliada através de ensaios de formação de placas de lise (PFA) em monocamadas da linha celular animal HT-29. O potencial virulento das estirpes testadas foi expresso como a média dos logaritmos decimais do número de placas formadas (log PFA).

A subtipificação dos isolados por PFGE mostrou que o conjunto dos isolados seleccionados, para o estudo do efeito da refrigeração sobre a virulência, apresentava uma elevada diversidade genética. Os resultados indicaram uma diminuição da virulência após refrigeração, em todas as estirpes utilizadas, embora a dependência do tempo pareça derivar da estirpe em causa. A manutenção de estirpes virulentas de *L. monocytogenes* em matrizes alimentares refrigeradas, que impeçam o seu crescimento, poderá provocar uma diminuição significativa da sua virulência inicial e, consequentemente, uma diminuição do risco para a saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, PFGE, PFA, virulência, refrigeração.

## Abstract

*Listeria monocytogenes* is a bacterial foodborne pathogen able to grow at refrigeration temperatures. In this work, in order to evaluate the effect of cooling on the virulence of this bacterium, under conditions of absence of growth, the effect of storage time at 7 °C (0, 1, 7 and 30 days) in 17 isolates and two reference strains for virulence was investigated. The isolates from different sources were characterized by PFGE and their pathogenicity was assessed with plaque-forming assays in HT-29 cell monolayers. The virulence potential of the strains was expressed as the mean value of the logarithms of the number of plaques formed (log PFA).

The subtyping of the isolates by PFGE showed that the isolates selected to study the effect of this cooling temperature on the virulence, showed a high genetic diversity. The results indicated a decrease in virulence after cooling in all strains, although the time dependence appeared to be a strain effect. Maintenance of virulent strains of *L. monocytogenes* in chilled food matrices, able to prevent its growth, may cause a significant decrease of its original virulence, and consequently a reduced risk to consumer health.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, PFGE, PFA, virulence, refrigeration.

## Extended Abstract

The bacterial genus *Listeria* currently comprises six species, but human cases of listeriosis are almost exclusively caused by the species *Listeria monocytogenes*. *Listeriae* are ubiquitous organisms whose main reservoirs are soil, silage and water. *L. monocytogenes* infection causes gastroenteritis, meningitis, neuro-encephalitis, chorioamnionitis, abortions and neonatal infections. Listeriosis is associated with a high mortality rate, particularly in immunocompromized individuals. In addition to its medical importance, *L. monocytogenes* contamination of food products raises important economic issues in the food industry. One specific characteristic of *L. monocytogenes* that appears to be critical to its ability to cause human foodborne illness is its capacity to grow at low temperatures. Although the cooling of food is increasingly used by the food industry and by the consumers, there are few studies on the effect of these temperatures on the virulence of *L. monocytogenes*.

In this work, the effect of storage time (during 0, 1, 7 and 30 days), at 7 °C, in the initial virulence of 17 isolates of *L. monocytogenes* and two reference strains was evaluated. Theses isolates included strains from different origins: five from frozen food, three from refrigerated food, five from refrigerated ready to eat (RTE) food, one from RTE food, two human strains and one strain isolated from the cheese dairy environment. To evaluate the phylogenetic relatedness among these isolates, including reference strains from each represented serovar, the subtyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed. PFGE is considered the gold standard method for subtyping foodborne pathogens, because of its high discriminatory power and reproducibility.

From the 26 isolates analyzed by PFGE, 24 pulsotypes (combined *Apal* and *Ascl* profiles) were identified. The relationships among *L. monocytogenes* strains based on their combined *Apal* and *Ascl* PFGE profiles were illustrated in a dendrogram and were supported by a cophenetic correlation coefficient ( $\rho$ ) equal to 0,90. This value explained the goodness of fit of the clustering to the original data and values higher than 0,80 are considered reasonable. Same Simpson Index of Discrimination (SID) value was achieved with *Apal* and with *Ascl*, separately, (0.991). The combination of patterns produced by both enzymes increased the discriminatory power up to 0,994. The subtyping of the isolates by PFGE showed that the isolates selected for the study of the effect of cooling in the virulence of the strains have a high genetic diversity and included strains representing the two main genetic lineages (I and II) of the species. Lineage I comprise strains predominantly isolated from human outbreaks and sporadic cases, and lineage II comprise strains mainly isolated from food.

The pathogenic potential of the isolates was assessed with plaque-forming assays in HT-29 cell monolayers, before and after submitting the strains to the respective times of storage at 7 °C. Experiments were carried out in duplicate and repeated three times for each strain. The results were expressed as the number of plaques (formed due to the lysis of the cell monolayer) obtained for 7 log *Listeria*. ANOVA of the log PFA values from the plaque – forming isolates was carried out using Scheffe test, by running the program Statistica, version 6 (Statsoft).

A decrease in the virulence in relation to the initial virulence was observed in all strains used in this study. This decrease was observed in some strains after 24 h of cooling. For other times tested, the trend was also to decrease the virulence, while the time dependence was variable and appeared to depend on the strain in question. The genetic variability of each strain, its serotype and its origin, probably contributed to this fact.

The information concerning the relationship between the pathogenicity of the strains and the cooling temperatures of storage is very scarce and poor updated. In previous studies, other authors used bacterial suspensions chilled in isotonic saline solutions devoid of nutrients, as in this study, and by using *in vivo* tests of virulence with chicken embryos, obtained results similar to ours.

However, other reports of the maintenance or even increasing of the virulence, after subjecting the isolates to cooling temperatures, were found in the literature. However, in such cases the isolates were stored under conditions that allowed growth (food matrices or culture media).

The results presented here suggest that the maintenance of virulent strains of *L. monocytogenes* in chilled food matrices, capable to prevent its growth, may cause a significant decrease of its original virulence, and consequently a reduced risk to consumer health.

In fact, in terms of assessing the risk posed by the presence of *L. monocytogenes* in foods subject to cold, foods that support the growth of *L. monocytogenes* should be the primary object of risk management efforts.

These results also emphasize the importance of good manufacturing practices (GMPs) together with sanitation standard operating procedures (SSOPs) throughout the food chain.

---

1.	Introdução .....	1
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i> : caracterização e classificação .....	1
1.1.1.	Morfologia.....	1
1.1.2.	Fisiologia .....	2
1.1.3.	Características bioquímicas.....	3
1.1.4.	Ecologia.....	4
1.2	Tipificação e subtipificação de <i>L. monocytogenes</i> .....	4
1.2.1	Métodos convencionais .....	4
1.2.1.1.	Tipificação por bacteriófagos .....	4
1.2.1.2.	Tipificação serológica .....	5
1.2.2.	Métodos moleculares.....	6
1.2.2.1.	Multiplex PCR .....	6
1.2.2.2.	Amplificação aleatória de DNA polimórfico .....	7
	(RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA).....	7
1.2.2.3.	Electroforese em campo pulsado.....	7
	(PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	7
1.3	A refrigeração de alimentos .....	8
1.4.	Mecanismos que contribuem para a sobrevivência e adaptação ao frio de <i>L. monocytogenes</i> .....	11
1.5.	Listeriose.....	13
1.5.1	Aspectos clínicos.....	13
1.5.2.	Mecanismo de invasão .....	14
1.5.3.	Alguns factores de virulência .....	16
1.5.3.1.	Internalinas .....	16
1.5.3.2.	Listeriolisina O .....	17
1.5.3.3.	Fosfolipases.....	17
1.5.3.4.	Proteína ActA.....	18
1.5.3.5.	PrfA uma proteína reguladora de transcrição.....	18
1.5.3.6.	p60 .....	18
1.5.3.7.	VirR .....	18
1.5.3.8.	Factor Sigma ( $\sigma$ ).....	19
1.6.	Métodos de avaliação da virulência.....	20
1.6.1.	Ensaio in vivo.....	20
1.6.2	Ensaio in vitro .....	21
1.7.	Enquadramento do trabalho e objectivos.....	22
2.	Materiais e Métodos .....	24
2.1.	Estirpes bacterianas e linha celular animal.....	24
2.2.	Soluções para o ensaio de PFA .....	26
2.2.1.	Tripsina-Versène (ATV) .....	26
2.2.2.	Inactivação do soro fetal bovino (SFB) .....	26
2.2.3	Soro fisiológico tamponado.....	27
2.2.4.	Solução mistura de penicilina e estreptomicina .....	27
2.2.5.	Solução de gentamicina.....	27
2.2.6.	Solução de L-glutamina .....	27
2.2.7.	Solução corante de azul de tripano.....	27
2.3.	Meios de cultura para o ensaio de PFA.....	28
2.3.1.	Meios sólidos.....	28
2.3.1.1.	CHROMagar Listeria.....	28
2.3.1.2.	Meio de cultura de agar de sangue.....	29
2.3.1.3.	Meio TSA-YE .....	29
2.3.2.	Meio líquido D-MEM .....	30
2.4.	Soluções utilizadas para o PFGE .....	31
2.4.1.	PFGE para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	31
2.4.1.1.	Solução tampão de equilíbrio da enzima .....	31

---



---

2.4.1.2. N-Laurilsarcosina 10 % (m/v).....	31
2.4.1.3. Tris-EDTA-N-Laurilsarcosina .....	31
2.4.1.4. TBE .....	32
2.4.1.5. Soluções de SeaKem Gold agarose .....	32
2.4.1.6. Solução de lise .....	32
2.4.1.7. TE pH 8 .....	33
2.4.1.8. Lisozima 10 mg / ml .....	33
2.4.1.9.SSP .....	33
2.4.1.10. Solução de restrição para a enzima Ascl .....	34
2.4.1.11. Solução de restrição para a enzima Apal .....	34
2.4.2 PFGE para Salmonella Braenderup (marcador) .....	34
2.4.2.1. Solução de lise .....	34
2.4.2.2. Solução tampão de equilíbrio da enzima .....	35
2.4.2.3. Suspensão tampão .....	35
2.4.2.4. SDS 1 % (m/v) SeaKem Gold agarose 1 % (m/v) .....	35
2.4.2.5. Solução de restrição para a enzima XbaI.....	36
2.5. Procedimento para a subtipagem molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
2.5.1. Acerto da concentração das suspensões bacterianas .....	36
2.5.2. Preparação do DNA de Salmonella enterica, serovar Braenderup H9812 (marcador molecular) .....	36
2.5.3.Preparação do DNA de <i>L. monocytogenes</i> .....	37
2.5.4.Lavagens.....	37
2.5.5. Reacções de restrição .....	37
2.5.6. Electroforese em campo pulsado.....	37
2.5.7. Aquisição da imagem do gel.....	38
2.5.8. Análise dos resultados do PFGE .....	38
2.6. Manutenção da linha celular animal.....	38
2.6.1. Procedimento para a tripsinização da linha celular HT-29 .....	39
2.6.2. Preparação do ensaio de infecção.....	39
2.6.3. Ensaio de formação de placas (Plaque Forming Assay-PFA).....	40
2.6.4. Recta de calibração ( $A_{600\text{ nm}} / \text{UFC ml}^{-1}$ ) .....	40
2.6.5. Preparação das diluições decimais das suspensões bacterianas para os ensaios de refrigeração .....	41
2.6.6. Infecção do tapete celular .....	41
2.6.7. Eliminação das células extracelulares .....	41
2.6.8. Deposição de agarose.....	41
2.6.9. Contagem das placas de lise e expressão e análise estatística dos resultados do PFA .....	42
3. Resultados e Discussão .....	43
3.1. Subtipificação dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> .....	43
3.2 O efeito do tempo de refrigeração a 7 °C na virulência de <i>L. monocytogenes</i> .....	46
4.Conclusões .....	50
5. Bibliografia .....	52

---

# 1. Introdução

## 1.1 *Listeria monocytogenes*: caracterização e classificação

O género *Listeria* contém oito espécies, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogénicas para o Homem e/ou animais, *L. seeligeri* é avirulenta, as outras cinco espécies, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* são saprófitas (Gopal *et al.*, 2010). Este género contém três espécies hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*), todas elas apresentam variações relativamente ao principal grupo de genes responsável pela virulência. Esse grupo de genes (*cluster*) inclui os genes virulentos *hly*, *prfA*, *plcA*, *mpl*, *actA* e *plcB*.

*L. monocytogenes* tem pelo menos 12 serovares identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7). Dos serovares conhecidos de *L. monocytogenes*, os serovares 1/2a, 1/2b e 4b são frequentemente associados às epidemias de listeriose. Estes serovares incluem estirpes responsáveis por 90% das infecções clínicas de listeriose (Armstrong, 1995). As estirpes dos serovares 1/2 são, na sua maioria, quase todas isoladas de alimentos. Isto pode sugerir que as estirpes do serovar 4b estão mais adaptadas aos tecidos dos mamíferos que as dos serovares 1/2 (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Apesar de estirpes do serovar 1/2 estarem mais associadas a isolados alimentares, o serovar 4b foi prevalente em isolados de queijo tradicional Português, produzidos a partir de leite de ovelha e de leite de vaca (Leite *et al.*, 2006; Chambel *et al.*, 2007).

### 1.1.1. Morfologia

*L. monocytogenes* é uma bactéria Gram positiva, não esporulada, não capsulada, em forma de bastonete e pleomórfica. Quando observada ao microscópio, em cultura fresca, apresenta uma forma isolada, em bacilos com dimensões de 1,0 – 2,0 µm × 0,5 µm. As células jovens, por vezes, apresentam uma morfologia que se pode facilmente confundir com diplococos ou cocos. Este organismo pode apresentar, ainda, uma formação em paliçada, ou em arranjos na forma de V ou de Y. Em contraste com a forma isolada, os bacilos neste caso chegam a medir 6 – 20 µm, ao fim de três a cinco dias de incubação. As culturas frescas são sempre Gram positivas, ao contrário das menos jovens, que ao fim de dois a cinco dias apresentam uma coloração Gram negativa (Ryser e Marth, 1991).

Para além das características morfológicas referidas, *L. monocytogenes* apresenta mobilidade através de flagelos, com movimentos característicos em cambalhota, que podem ajudar na identificação do organismo. Estes movimentos são bem observados em cultura

líquida de triptose, a 20 °C. Para observação do teste de mobilidade, é muito importante que a temperatura seja próxima da temperatura ambiente, uma vez que a 37 °C a bactéria pode perder um ou todos os flagelos (citado por Ryser e Marth, 1991).

### 1.1.2. Fisiologia

*L. monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, uma propriedade que é vantajosa durante o processo de infecção. Cresce bem em laboratório em condições aeróbicas. Apesar do BHI (*Brain Heart Infusion*) ser o meio de cultura mais utilizado para o seu crescimento, esta bactéria cresce bem noutros meios, como é o caso do LB (*Luria Broth*). Em meio de cultura sólido, as colónias podem ser observadas através da luz oblíqua descrita por Henry. Este método, com a prática, pode ser usado para distinguir colónias de *L. monocytogenes* de outras colónias contaminantes.

Uma das propriedades de *L. monocytogenes* é crescer a temperaturas entre 1 e 45 °C, o que vai favorecer o seu desenvolvimento nos alimentos, embora a sua temperatura óptima de crescimento se situe entre os 30 e os 37 °C. Após 24 h de incubação a 37 °C, as colónias típicas apresentam-se redondas, translúcidas, ligeiramente raiadas com uma textura superficial fina, consistência aquosa, azul acinzentada sobre iluminação normal e com margem definida. As colónias podem ter diâmetro entre 0,3 e 1,5 mm, dependendo do número de colónias à superfície do meio de cultura. Após cinco a dez dias de incubação, as colónias podem chegar a ter três a cinco milímetros de diâmetro. Repicagens sucessivas podem conduzir a outro tipo de morfologia das colónias.

*L. monocytogenes* também cresce em agar de sangue, onde após 48 h de incubação a 37 °C as colónias podem atingir um diâmetro de 0,2 a 1,5 mm e apresentam um halo correspondente à hemólise. Se a hemólise for fraca, a zona do halo só pode ser visualizada após a colónia ser retirada da superfície do agar. Uma incubação prolongada melhora a visualização da hemólise.

Ao inocular *L. monocytogenes* em meio líquido de triptose a 37 °C, observa-se uma turvação no meio após 18 – 24 h. O crescimento é menor, com menor turvação, à superfície do meio, indicando assim que o microrganismo cresce melhor numa zona onde o oxigénio é reduzido (citado por Ryser e Marth, 1991). Observa-se, também, um excelente crescimento quando parte do oxigénio é substituído por dióxido de carbono, apesar de *L. monocytogenes* não crescer em condições de anaerobiose estrita.

Este microrganismo não resiste a temperaturas de pasteurização.

Para minimizar o risco do consumo de alimentos contaminados, *L. monocytogenes* é actualmente detectada segundo o método da EN ISO 11290-1, modificado em Fevereiro de 2005. Neste método, o meio de cultura PALCAM (polymyxina-acriflavina-LiCl-ceftazidima-esculina-manitol) foi substituído pelo meio de cultura ALOA (agar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti) (Vlaemynck *et al.*, 2000). A detecção de *L. monocytogenes* por este novo meio de cultura baseia-se na actividade do fosfatidilinositol fosfolipase que faz com que *L. monocytogenes* seja detectada em dois dias, enquanto que a detecção no meio de cultura anterior (PALCAM) era baseada na actividade da esculina, uma enzima metabólica comum a *Listeria* spp., que não distingue *L. monocytogenes* das outras espécies de *Listeria*. Por essa razão, era necessário recorrer a outros métodos de confirmação (Roche *et al.*, 2009).

### 1.1.3. Características bioquímicas

*Listeria* spp. possui as seguintes características bioquímicas; catalase positiva, oxidase negativa, urease negativa, teste do vermelho de metilo/Voges – Proskauer (MR/VP) (+/+). A esculina, o hipurato de sódio e os ácidos (lático, acético, isobutírico, isovalérico e ácido fenilacético) são hidrolisados, mas não há produção de gás na fermentação da glucose (Daneshvar *et al.*, 1989; Pine L. *et al.*, 1989). Facto importante para o sector alimentar é que este microrganismo não hidrolisa a gelatina, a caseína ou o leite.

A maior parte das estirpes de *L. monocytogenes* produz ácidos a partir de certos açúcares (maltose, ramnose, salicina, levulose e trealose) mas não são capazes de o fazer com outros açúcares, tais como; manitol, xilose, melibiose, dulcitol, adonitol, inositol, arabinose, rafinose, sacarose e inulina. Uma produção baixa de ácido ou mesmo uma produção irregular pode ser observada na presença dos seguintes açúcares; lactose, galactose, melezitose, sorbitol e dextrina (Seeliger e Jones, 1987).

### 1.1.4. Ecologia

*Listeria* spp. são microrganismos ubíquos pois encontram-se numa grande diversidade de ambientes, tais como: solo, água, efluentes, alimentos, fezes humanas e animais. O habitat natural é a matéria vegetal em decomposição, no qual vive como saprófita (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Os ruminantes representam um papel importante na presença deste microrganismo no ambiente rural, devido ao seu ciclo fecal oral contínuo (Fleming *et al.*, 1985).

Este patógeno pode existir no meio ambiente no estado planctónico ou em biofilmes, ligados a determinadas superfícies onde formam matrizes constituídas por polissacáridos. Os biofilmes de *Listeria* são uma preocupação para a Indústria Alimentar, porque nesta forma as bactérias são mais resistentes aos desinfetantes e às acções de sanitização (Mah *et al.*, 2001; Lewis, 2001).

## 1.2 Tipificação e subtipificação de *L. monocytogenes*

A maior parte das bactérias têm, ao nível da espécie, diferenças fenotípicas e genotípicas suficientes, que as distinguem nos diferentes subtipos.

Os vários subsistemas de tipificação, mais à frente descritos, apresentam diferentes graus de discriminação, dos isolados de *L. monocytogenes*. Distinguir estirpes, ou grupos de estirpes, usando estes métodos, em estudos epidemiológicos, veio permitir aos investigadores, obter informação sobre relações entre isolados, identificar surtos de listeriose, fontes de infecção, manifestações esporádicas da doença e determinar o modo de transmissão do microrganismo (Ryser e Marth, 2007).

### 1.2.1 Métodos convencionais

#### 1.2.1.1. Tipificação por bacteriófagos

Este sistema de tipificação baseia-se na lise ou na destruição das bactérias, como resultado da infecção por um bacteriófago. A diferente sensibilidade das estirpes bacterianas à acção dos vírus infectantes, permite subdividir as estirpes de um mesmo serovar em diferentes fagovares (Farber e Peterkin, 1991).

No entanto, o recurso a este sistema de tipificação também se tem revelado pouco eficaz, visto apresentar uma baixa percentagem de estirpes tipificáveis, sobretudo as pertencentes ao serogrupo 1/2 (cerca de 50%), uma baixa disponibilidade e especificidade dos fagos para outros serovares (eg. 3, 4a, 4c, 4d, 4e e 7) que raramente causam doença (Farber e Peterkin, 1991), bem como o facto de ser um sistema muito trabalhoso e nem sempre reprodutível (McLauchlin *et al.*, 1996).

A tipificação por fagos era a única forma de distinguir estirpes dentro do mesmo serótipo, até ao aparecimento dos métodos moleculares. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso em avaliações clínicas e epidemiológicas envolvendo infecções recorrentes em humanos, e fontes comuns de surtos (Swaminathan *et al.*, 1995).

### 1.2.1.2. Tipificação serológica

Paterson, ao usar os métodos serológicos de Kauffmann e White, identificou quatro tipos serológicos de *L. monocytogenes*, baseados na estrutura do antígeno somático O e do antígeno flagelar H. Os serótipos 1, 3 e 4 foram diferenciados com base no antígeno O, enquanto o serótipo 2 foi identificado com base num único antígeno H. Após outros antígenos O serem identificados, Seeliger dividiu o serótipo 4 em 4a e 4b. Donker e Voet acrescentaram os serótipos 4c, 4d, e 4e à lista dos serótipos conhecidos de *L. monocytogenes*. Ligeiras diferenças encontradas nos antígenos H, foram também encontradas em algumas culturas dos serótipos 1 e 3, o que conduziu à criação de mais dois serótipos, 1a e 3a (citado por Ryser e Marth, 1991).

Contudo, só a serotipagem, sem outra caracterização bioquímica, é inadequada para a identificação de *L. monocytogenes*, uma vez que este microrganismo partilha alguns dos antígenos O e H presentes noutras *Listeria* spp. Apesar da serotipagem ser uma ferramenta indispensável na identificação de isolados de *L. monocytogenes*, esta técnica é limitada em estudos de epidemiologia de listeriose, uma vez que 95 % dos isolados pertencem apenas a três serótipos (1/2a, 1/2b e 4b).

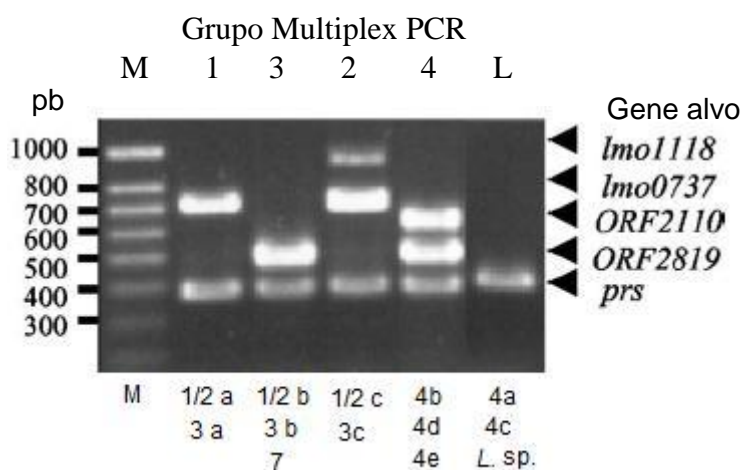
Em resumo, estas técnicas apresentam algumas limitações. A serotipificação e a fagotipificação são técnicas muito morosas e pouco discriminantes (Bubert *et al.*, 1992). Estas metodologias necessitam, também, de utilizar reagentes específicos, os quais são produzidos a nível mundial apenas por alguns laboratórios de referência (Farber e Peterkin, 2000).

## 1.2.2. Métodos moleculares

### 1.2.2.1. Multiplex PCR

Recentemente, diferentes autores propuseram métodos baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reacção em cadeia da polimerase) para a serotipagem molecular de *L. monocytogenes* (Borucki *et al.*, 2003; Doumith *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). O ensaio de multiplex PCR proposto por Doumith *et al.* é baseado na utilização de cinco pares de primers capazes de agrupar as estirpes de *L. monocytogenes* em quatro grupos filogenéticos relacionados com o serovar (excepto o serovar 4ab, que por ser extremamente raro não foi testado) (Doumith *et al.*, 2004). O par de primers para o fragmento do gene *prs* (370 pb) é universal para todas as espécies de *Listeria*. Estirpes pertencentes ao grupo 1 (1/2a-3a) geraram um fragmento amplificado a partir do gene *lmo0737* (691 pb). Estirpes do grupo 2 (1/2c-3c) produziram dois fragmentos a partir do gene *lmo0737* (691 pb) e *lmo1118* (906 pb). O grupo 3 (1/2b-3b-7) amplificou um fragmento a partir da *ORF2819* (471 pb). Por fim, estirpes do grupo 4 geraram dois fragmentos a partir da *ORF2819* (471 pb) e da *ORF2110* (597 pb) (Fig.1).

Contudo, este método não diferencia o serovar 1/2a do 3a, o 1/2c do 3c, o 1/2b do 3b e do 7, e o 4b do 4d e do 4e. Isolados dos serovares 4a e 4c, para além de outros isolados de outras espécies de *Listeria*, também não são distinguidos por este método (Doumith *et al.*, 2004).



**Fig.1** - Fragmentos de DNA amplificados a partir de estirpes de referência de *L. monocytogenes*, por Multiplex-PCR, e resolvidos através de electroforese em gel de agarose. Em baixo, indicam-se os serovares correspondentes (adaptado de Doumith *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.2. Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*)

Este método utiliza a técnica de PCR, para a detecção de polimorfismos do DNA, através da amplificação genómica com *primers* com cerca de 10 bases, de sequências arbitrárias. Os produtos de amplificação resultantes são posteriormente visualizados recorrendo à electroforese em gel de agarose (Farber e Peterkin, 2000). A grande vantagem deste método consiste no facto de não haver necessidade de um conhecimento prévio do genoma (Farber *et al.*, 1996). Por outro lado, é igualmente um método que pode ser realizado de uma forma relativamente simples analisando cada estirpe com um determinado número de primers e combinando depois os resultados (Wernars *et al.*, 1996).

A temperatura de hibridação do RAPD é mais baixa do que a de um PCR normal e, desta forma, um único primer sem reconhecida homologia com o genoma, consegue emparelhar em locais onde a homologia é imperfeita. Tal ocorre porque, sendo a temperatura de hibridação mais baixa, a probabilidade de hibridação não específica aumenta. Nesta técnica pode ser usado DNA purificado, no entanto as células bacterianas não sujeitas a lise ou os sobrenadantes de células que sofreram lise são igualmente eficazes na obtenção de resultados. A maior desvantagem deste método é a falta de reprodutibilidade entre laboratórios diferentes. Porém, pode ser considerado um método rápido, uma vez que é necessário menos de um dia para se obterem resultados (Farber e Peterkin, 2000).

Este método apresenta inúmeras aplicações nos campos da epidemiologia, genética molecular e taxonomia, entre outros, tendo-se revelado rápido e eficaz na diferenciação de *L. monocytogenes* (Destro *et al.*, 1995; Cabrita *et al.*, 2004), apresentando-se assim como um instrumento valioso na monitorização de surtos de listeriose (Farber e Addison, 1994).

#### 1.2.2.3. Electroforese em campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Através da electroforese convencional não é possível separar (resolver) fragmentos de DNA de dimensão superior a 20 kb. Para a separação de fragmentos com dimensões compreendidas entre 20 e 50 kb é necessário o uso de géis com uma concentração de agarose muito baixa. Acima desses tamanhos, não há diferenças de mobilidade que permitam a separação das moléculas (Brito, 2008).



De forma a obter uma melhor diferenciação dos isolados, outros métodos de subtipificação têm sido desenvolvidos. Um desses métodos é a electroforese em campo pulsado (PFGE), actualmente o mais usado para a subtipificação molecular de bactérias patogénicas de origem alimentar, incluindo *L. monocytogenes*.

Esta técnica utiliza campos eléctricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direcção. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação. O parâmetro crítico que afecta a separação das moléculas é o tempo de pulso (duração da aplicação do campo eléctrico numa dada direcção). Foram desenvolvidos aparelhos com diversos tipos de configurações de eléctrodos. O sistema de campo eléctrico homogéneo (CHEF – *Contour-Clamped Homogeneous Electrical Field*) é, actualmente, o mais usado e apresenta uma série de eléctrodos dispostos nos lados de um hexágono e com os dois campos eléctricos formando um ângulo de 120°. Ao longo de cada um dos lados do hexágono forma-se uma distribuição gradual de potenciais, que dá origem a um campo eléctrico homogéneo em todo o gel.

Neste trabalho, a técnica de PFGE foi utilizada para a caracterização dos isolados de *L. monocytogenes*, de acordo com o protocolo padronizado da PulseNet (Graves e Swaminathan, 2001; CDC-Pulsenet).

#### 1.2.2.4. Linhagens genéticas

Resultados obtidos a partir de estudos genéticos ou de tipificação de *L. monocytogenes* sugerem a existência de três linhagens genéticas nesta espécie relacionadas com os serovares presentes em *L. monocytogenes*. Linhagem I, constituída por isolados que apresentam antígenos flagelares tipo b e d, mais associadas a casos de surtos alimentares. Linhagem II, onde se incluem isolados com antígenos tipo a ou c e linhagem III, onde estão representadas estirpes pertencentes aos serovares 4a e 4c e algumas estirpes 4b (Brosh *et al.*, 1994; Wiedmann *et al.*, 1997; Neves *et al.*, 2008).

### 1.3 A refrigeração de alimentos

*L. monocytogenes* é um dos microrganismos patogénicos alimentares mais preocupante, devido a vários factores: como é um microrganismo ubíquo que pode contaminar os alimentos por várias vias, consegue sobreviver em biofilmes, é um microrganismo psicrotolerante e, por esse motivo, mesmo estando o alimento refrigerado, a bactéria continua a multiplicar-se, podendo alcançar níveis perigosos. Alguns exemplos disso são os produtos de charcutaria à base de carne, que têm um prazo de validade relativamente

alargado, não sofrendo mais nenhum tratamento térmico até à altura de serem consumidos (Concepción *et al.*, 2007).

Apesar do microrganismo não resistir à fervura e até mesmo à pasteurização (72 °C, 15 s) tem sido detectada a sua presença em queijos confeccionados com leite cru, com leite pasteurizado e mesmo em alimentos cozinhados. Isto resulta de estes alimentos não sofrerem o aquecimento necessário, ou sofrerem uma eventual contaminação após a sua confecção (Ramaswamy *et al.*, 2007).

A mudança dos hábitos alimentares, em especial nas grandes cidades, onde as pessoas trabalham mas não habitam e por isso perdem muito tempo em transportes, fez com que o consumo de alimentos “Ready to Eat – RTE” (prontos a comer) e “Heat and Eat – HAE” (aquecer e comer) quer de origem animal, quer de origem vegetal, tivesse aumentado nos últimos anos. Para este fenómeno contribuiu a globalização, que também atingiu a área alimentar. Os alimentos RTE, como por exemplo os produtos de charcutaria, são os mais sujeitos a manipulação, antes de chegarem ao consumidor, o que constitui um risco, uma vez que estes alimentos não sofrem nenhum aquecimento posterior. Por exemplo, o mercado dos fiambres já fatiados e embalados tem vindo a aumentar e, em alguns países, tornou-se a maior via de distribuição deste produto (Concepción *et al.*, 2007).

No início dos anos 90 do século passado, e para dar resposta a este problema, a Indústria Alimentar implementou um conjunto de regras, como códigos de boas práticas e análise de riscos, conseguindo assim reduzir o número de alimentos contaminados com esta bactéria (Ramaswamy *et al.*, 2007). Apesar das estatísticas efectuadas indicarem que o número de casos de listeriose tem diminuído, o facto é que estes casos continuam a acontecer. Em 2008, no Canadá, ocorreu um surto de listeriose, que resultou em 53 casos confirmados, 6 suspeitos, 20 mortes e uma onda de histeria na comunicação social naquele país. Este surto teve consequências alarmantes e levantou novas questões sobre a eficácia da legislação em vigor, na diminuição do risco de surtos de listeriose (Warriner e Namvar, 2009).

A colaboração do Estado, das Agências de Saúde públicas, da Indústria Alimentar e dos consumidores é necessária para a determinação do risco associado ao consumo dos vários tipos de alimentos, dos mecanismos de virulência de *L. monocytogenes*, e da incidência e epidemiologia da listeriose.

A gama de temperaturas em que *L. monocytogenes* consegue crescer é muito importante no processamento dos alimentos, pois esta bactéria consegue desenvolver-se a temperaturas de refrigeração, embora o seu crescimento, a essas temperaturas, seja fortemente afectado pelo pH do meio (Tienungoon *et al.*, 2000). Como a maior parte das bactérias, *L. monocytogenes* cresce a valores de pH perto da neutralidade. Vários estudos

relatam crescimentos a pH entre 4,0 e 9,6. Quando não existem outros factores a limitarem o seu crescimento, pode ocorrer crescimento a valores de pH entre 6,0 e 8,0. Por exemplo, *L. monocytogenes* desenvolve-se bem, no queijo Camembert e no queijo Brick, que têm valores de pH superiores a 5,9.

A maioria dos produtos frescos tem um  $a_w$  superior a 0,98 (Anónimo, 2003). A secagem e a adição de sal ou de açúcar, são métodos tradicionalmente usados para baixar o valor de  $a_w$ . Estes procedimentos têm como objectivo aumentar o tempo de vida dos alimentos. *L. monocytogenes* apresenta um valor de  $a_w$  óptimo para o crescimento superior ou igual a 0,97, mas consegue sobreviver e até mesmo crescer em alimentos com  $a_w$  baixo (<0,90) (Nolan *et al.*, 1992). *L. monocytogenes* tolera elevadas concentrações de sal. Consegue multiplicar-se na presença de cloreto de sódio (10 a 20 %). Este patógeno sobreviveu num queijo comercial (em salmoura, com 23,8 % de sal e pH igual a 4,9) armazenado a 4 °C, durante 259 dias (Larson *et al.*, 1999).

O primeiro estudo sobre a capacidade desta bactéria crescer a baixas temperaturas foi publicado, em 1948, por Gray *et al.* que descobriram que *L. monocytogenes* era capaz de crescer a 4 °C, após períodos de armazenamento de 3 dias até 3 meses. Outro estudo demonstrou que *L. monocytogenes* sobrevive, a baixas temperaturas, no solo, nas fezes dos animais, em reservatórios de água e em silagem por períodos de tempo que podem chegar até aos 450 dias (Fenlon, 1999).

Esta tolerância ao frio contribui para a sua disseminação nos produtos alimentares refrigerados. O uso de baixas temperaturas durante o processamento dos alimentos e durante o seu armazenamento, a longo prazo, é ineficaz para o combate à proliferação desta bactéria, embora seja um bom método para controlar outros patógenos alimentares.

O crescimento deste microrganismo, posteriormente à contaminação inicial, é particularmente importante se se trata de alimentos RTE, porque este tipo de alimentos apresentam características físico químicas que permitem o crescimento microbiano e, também, porque são refrigerados por longos períodos de tempo.

O número de casos de listeriose pode ser reduzido se se conseguir reduzir, ou mesmo eliminar, o crescimento de *L. monocytogenes* nestes produtos. Em França, após vários surtos de listeriose associados ao consumo de produtos RTE (“rillettes” e língua de porco “in gelly”) os prazos de validade desses mesmos produtos foram reduzidos de 48 para 28 dias, uma vez que se sabe que o crescimento de *L. monocytogenes* durante a refrigeração é um dos factores críticos (de Valk *et al.*, 2001).

Em conclusão, enquanto *L. monocytogenes* se consegue desenvolver em muitos ambientes e alimentos, um variado número de factores pode afectar a sua taxa de crescimento e a sua fase lag, a baixas temperaturas. Os mecanismos específicos, que

podem ser usados por esta bactéria, para facilitar o seu crescimento a baixas temperaturas dependem, provavelmente, da matriz alimentar e do próprio ambiente.

### **1.4. Mecanismos que contribuem para a sobrevivência e adaptação ao frio de *L. monocytogenes***

A adaptação molecular típica, face ao stresse provocado pelo frio nestes microrganismos, baseia-se na sua adaptação às seguintes alterações: diminuição da fluidez da membrana, o que vai influenciar ou mesmo diminuir a capacidade de captar nutrientes, o aumento do enrolamento helicoidal do DNA, o que vai afectar a replicação e a transcrição do DNA, alterações nas estruturas secundárias do RNA, que vão afectar a tradução, a redução da actividade enzimática e a adaptação dos ribossomas e o seu funcionamento apropriado, a baixas temperaturas (Graumann e Marahiel, 2000).

Outros autores referem o aumento da permeabilidade aos solutos compatíveis e a síntese de várias proteínas designadas por proteínas do choque ao frio (Csps) e proteínas de adaptação ao frio (Caps).

Solutos compatíveis são, normalmente, moléculas de pequena massa molecular, mas de elevada solubilidade, não alteram o pH e são conhecidos pela sua função osmoprotectora, quer dos microrganismos eucariotas, quer dos procariotas. Estas moléculas podem ser acumuladas em elevadas concentrações dentro da célula, em resposta ao aumento da osmolaridade no exterior da célula. Desta forma, mantêm o equilíbrio, dentro e fora da célula, sem afectar as funções citoplasmáticas (Yancey *et al.*, 1982). Betaína glicina, carnitina, acetilcarnitina, Y-butirotbetaína, betaína prolina e dimetilsulfoniopropionato tem demonstrado uma acção osmoprotectora em *L. monocytogenes* (Bayles e Wilkinson, 2000).

Estudos efectuados sobre a membrana celular e sobre o efeito de substâncias osmoprotectoras, ajudaram a compreender como este patógeno mantém as suas funções fisiológicas a baixas temperaturas.

As proteínas, cuja síntese é induzida pela diminuição da temperatura, têm sido classificadas por proteínas de choque ao frio (CSPs - *cold shock proteins*) ou proteínas de aclimação ao frio (CAPs – *cold acclimation proteins*) (Graumann e Marahiel, 2000). Alguns estudos classificaram as CSPs como todas as proteínas induzidas pelo choque térmico e as CAPs como um subgrupo das CSPs (Bayles *et al.*, 1996; Graumann e Marahiel, 2000). Contudo, a nomenclatura das diferentes proteínas induzidas pelo frio, ainda não é consensual entre diferentes autores e, ou, diferentes espécies bacterianas. Em geral, as CSPs representam uma classe de proteínas, que é definida mais pelos seus padrões de

expressão, do que por uma função específica (Phan-Thanh e Gormon, 1995; Bayles *et al.*, 1996; Thieringer *et al.*, 1998). No genoma de *L. monocytogenes* foram descobertos genes de três famílias de proteínas Csp (CspA, CspB e CspD). Foi estabelecida uma hierarquia destes genes (*cspA*>*cspD*>*cspB*) segundo a sua importância na adaptação de *L. monocytogenes* ao frio (4 °C e 10 °C) (Schmid *et al.*, 2009).

É essencial que a estrutura fosfolipídica da membrana se mantenha líquida e cristalina, de modo a manter a fluidez e, consequentemente, o crescimento da bactéria, mesmo a baixas temperaturas. A fluidez da membrana lipídica altera-se, com as variações da temperatura, diminuindo quando a temperatura diminui (Wouters *et al.*, 2000). A diminuição da fluidez da membrana pode afectar o transporte de nutrientes, tais como hidratos de carbono e aminoácidos, que vão influenciar o crescimento da bactéria (Nedwell e Rutter, 1994). A alteração da temperatura provoca uma conversão reversível do líquido cristalino da membrana, quando a membrana se encontra a uma temperatura óptima de crescimento, dando lugar a um gel quando a mesma bactéria cresce a uma temperatura de refrigeração (Suutari e Laakso, 1994). Um mecanismo utilizado por *L. monocytogenes*, na adaptação da fluidez, é a alteração da composição em ácidos gordos da membrana celular. Vários estudos demonstraram que, a temperaturas baixas, na membrana celular de *L. monocytogenes* há uma diminuição dos ácidos gordos na forma *iso* e um aumento da concentração de ácidos gordos na forma *anteiso*, sendo o *anteiso*-C<sub>15:0</sub> predominante, seguindo-se o *anteiso*-C<sub>17:0</sub> (Annaus *et al.*, 1997).

Apesar de ainda não ser bem conhecido o motivo pelo qual o stresse provocado pelo frio, induz a produção de flagelos em *L. monocytogenes*, a mobilidade tem sido associada à formação de biofilmes em outros microrganismos. O facto de o stresse frio induzir a formação de biofilmes, poderá ser uma estratégia adaptativa destes microrganismos a ambientes deste tipo. A resposta bacteriana à adaptação e crescimento a baixas temperaturas deve-se à expressão de diferentes tipos de proteínas, que vão facilitar a sua sobrevivência e o seu crescimento nessas condições. A regulação da resposta ao choque térmico inclui um aumento da transcrição dos genes responsáveis pela adaptação e crescimento a baixas temperaturas (Kaan *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2006; Budde *et al.*, 2006). Observa-se, em simultâneo, uma diminuição da transcrição de genes que codificam proteínas, que não são necessárias ou determinantes para o crescimento e sobrevivência da bactéria a essa temperatura (Johansson *et al.*, 2002; Kaan *et al.*, 2002; Budde *et al.*, 2006).

## 1.5. Listeriose

### 1.5.1 Aspectos clínicos

A listeriose, a doença causada por *L. monocytogenes*, pode ser transmitida dos animais ao Homem, através da ingestão de alimentos contaminados. No caso de *L. monocytogenes* a dose que é necessário ingerir para causar doença, é muito mais elevada do que no caso de outras bactérias patogénicas, como por exemplo *Escherichia coli* O157:H7 (10 UFC). No caso de *L. monocytogenes*, foi estimado que, em média, uma pessoa saudável pode ingerir, num alimento, de  $10^6$  a  $10^9$  UFC de *L. monocytogenes*, a cada dois anos, sem que contraia doença (Anónimo 2003; Anónimo 2005).

Podem distinguir-se duas formas básicas da doença: listeriose invasiva e listeriose não invasiva. A listeriose invasiva corresponde à disseminação da infecção no sistema nervoso central e pode resultar em meningite. A infecção da placenta pode resultar em aborto ou infecções perinatais (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001). O tempo médio de incubação para esta forma de doença é de 30 a 90 dias.

A listeriose não invasiva pode provocar gastroenterites, com febre (Salamina *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1997). O período de incubação é bastante mais pequeno, do que na listeriose invasiva, sendo necessárias apenas 18 a 20 horas até ao surgimento dos primeiros sintomas.

A listeriose, embora seja considerada de origem alimentar, pode também ser transmitida por outras vias: via ocular, respiratória e urogenital. Os casos de listeriose cutânea, conjuntivite e pneumónica têm sido verificados em indivíduos que contactam directamente com animais infectados. A infecção transplacentária e a transmissão a partir do canal vaginal durante o nascimento podem ser a causa de infecções perinatais e neonatais (Gahan *et al.*, 1991).

A camada da população mais afectada por este tipo de infecções são todos os indivíduos que de alguma maneira estão imunocomprometidos (“YOPIs - young, old, pregnant, immunocompromised”). A taxa de mortalidade para este grupo pode chegar aos 40% (revisto por Brito L., 2003). A categoria dos imunocomprometidos inclui pessoas com SIDA, doentes que tomam medicamentos imunossuppressores, como por exemplo corticoesteróides usados no tratamento do cancro (Rocourt e Cossart, 1997).

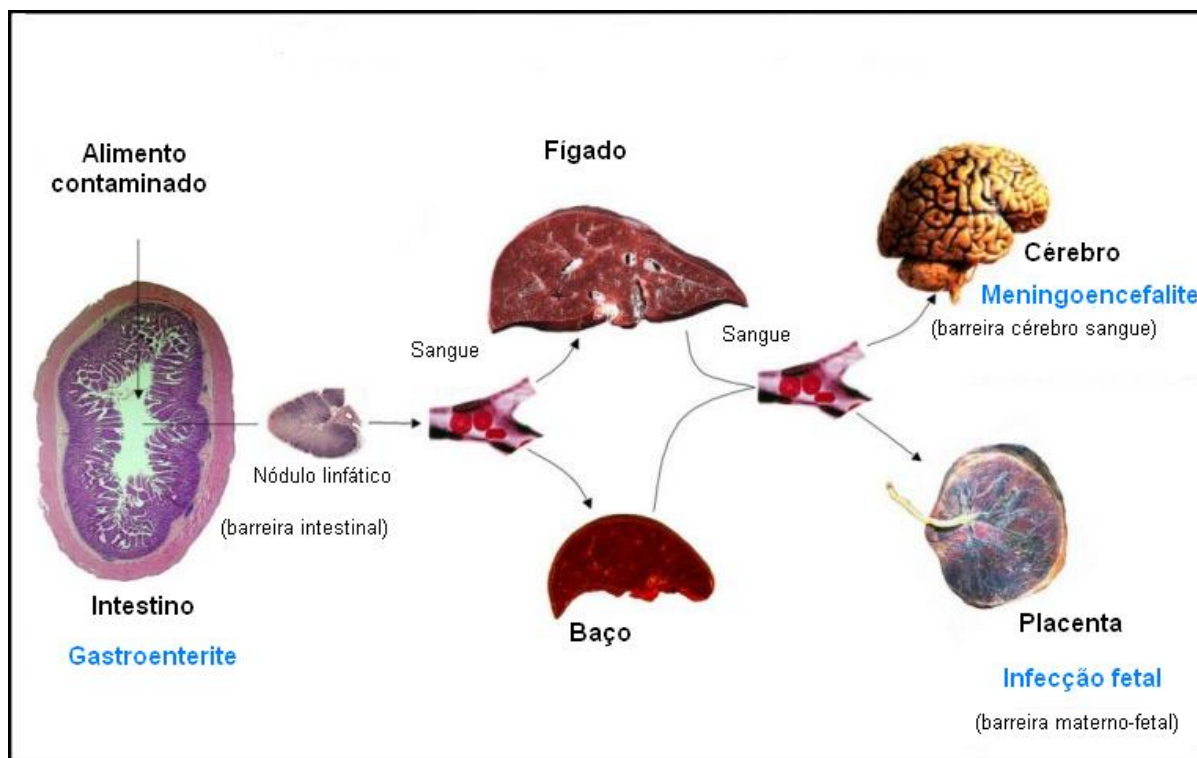


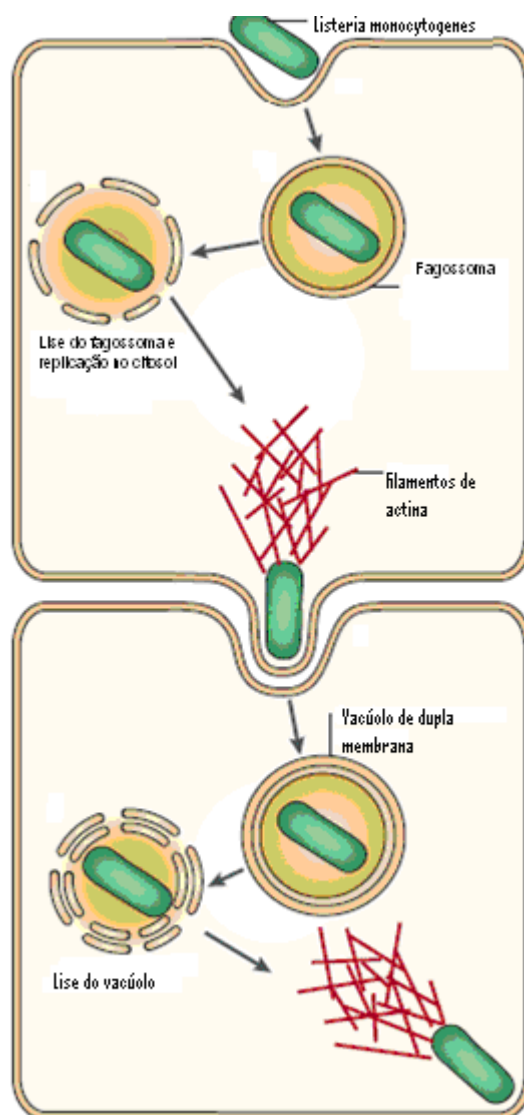
Figura 2- Representação esquemática da patofisiologia de uma infecção por *Listeria* (adaptado de Khelef, 2006).

### 1.5.2. Mecanismo de invasão

Uma das vias mais comuns de infecção por *L. monocytogenes* consiste na ingestão de alimentos contaminados. Ao passar pelo aparelho digestivo pode ocorrer uma diminuição na carga contaminante, uma vez que o pH do estômago é muito baixo (próximo de 2). Indivíduos que, por qualquer necessidade terapêutica, tomam antiácidos ficam mais vulneráveis a infecções provocadas por este microrganismo (Ho *et al.*, 1986; Schuchat *et al.*, 1992). Esta bactéria consegue passar a barreira intestinal e através da corrente sanguínea e linfática chega ao fígado. Se o hospedeiro for imunocomprometido, pode ocorrer a disseminação da bactéria por todo o organismo do hospedeiro (Rocourt e Cossart, 1997).

A invasão de *L. monocytogenes* pode ocorrer em vários tipos de células; epiteliais, fibroblastos, hepatócitos, endoteliais e vários tipos de células nervosas, como por exemplo os neurónios (Fig. 2).

O ciclo de vida de *L. monocytogenes* na célula hospedeira ocorre em quatro etapas: 1 - entrada na célula; 2 - lise do vacúolo e multiplicação intracelular; 3 - polimerização da actina e deslocação intracelular; 4 - disseminação para as células vizinhas (Fig. 3).

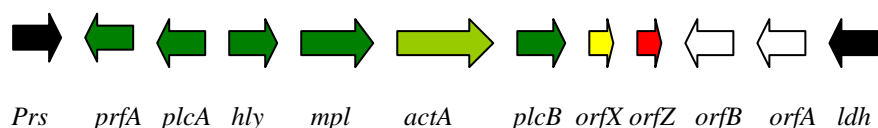


**Fig. 3** - Esquema do ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (adaptado de Hamon, 2006)



### 1.5.3. Alguns factores de virulência

Os genes virulentos de *L. monocytogenes* estão na sua maioria organizados em unidades genéticas conhecidas como ilhas de patogenicidade (*Pathogenicity Islands- PAIs*). As ilhas de patogenicidade são, presumivelmente, adquiridas pelas bactérias por transferência horizontal de genes e, por essa razão, têm um papel importante na evolução da virulência bacteriana. Seis dos genes virulentos responsáveis pelos passos chave do parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*) estão fisicamente ligados numa ilha cromossomal de 9 kb, conhecida por LIPI-1 (de “*Listeria pathogenicity island 1*”) (revisto por Brito, 2003) (Fig.4).



**Fig. 4** - Estrutura genética da região cromossomal LIPI-1.

Os genes pertencentes ao LIPI-1 estão representados a verde. O gene mais divergente está representado a verde claro (*actA*) (adaptado de Vásquez-Boland *et al.*, 2001)

As internalinas pertencem a uma família de genes, exclusiva de *Listeria*. Excepto os genes *inlC* e *inlF* de *L. monocytogenes*, os outros membros desta família encontram-se em “clusters” de dois a vários genes, todos orientados na mesma direcção (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

A sequenciação de todo o genoma de *L. monocytogenes* e de *L. innocua* (Glaser *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2004) veio facilitar a identificação de novos genes específicos relacionados com a virulência. Por exemplo, a presença do gene *Imo2821* (*inlJ*) é importante na distinção de estirpes de *L. monocytogenes* virulentas, de não virulentas. O gene *Imo2821* está presente nas estirpes virulentas de *L. monocytogenes*, capazes de provocar surtos de listeriose e mortalidade em murganhos, mas ausente nas estirpes não virulentas. (revisto por Liu, 2006).

#### 1.5.3.1. Internalinas

*L. monocytogenes* entra na célula do hospedeiro através de um processo de fagocitose (Fig.3). Algumas células, como os macrófagos, são células fagocíticas profissionais, outras como as células epiteliais ou endoteliais são fagócitos não profissionais. Neste caso, estas células (não profissionais) têm de ser induzidas para realizarem a fagocitose. A internalina A é uma proteína que tem uma acção importante na penetração de

*L. monocytogenes* nas células não fagocíticas, como por exemplo nas células do epitélio (Gaillard *et al.*, 1991). A internalina A liga-se a uma outra proteína, a E-caderina, na superfície da célula epitelial humana. Outra proteína relacionada com a internalina A, é a internalina B que está directamente ligada à invasão de hepatócitos, no fígado.

#### 1.5.3.2. Listeriolisina O

Todas as estirpes patogénicas de *L. monocytogenes* são hemolíticas, sendo a listeriolisina O (LLO), uma proteína de 58 kDa codificada pelo gene *hly*, considerado um dos principais factores ligados à virulência (Portnoy *et al.*, 1988; Benedict, 1990; Dubail *et al.*, 2001). O gene *hly* foi o primeiro factor de virulência a ser determinado e sequenciado em *L. monocytogenes*.

Existe uma forte correlação entre a actividade hemolítica e a patogenicidade no género *Listeria* (as duas espécies patogénicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, são hemolíticas, todas as outras espécies, não patogénicas, à excepção de *L. seeligeri*, não são hemolíticas). Ensaio efectuados com culturas de células animais, para a avaliação do efeito da inactivação do gene *hly*, demonstraram que a hemolisina é necessária para a sobrevivência e proliferação de *L. monocytogenes* nos macrófagos e nos fagócitos não profissionais. A proteína LLO não só está envolvida na lise do primeiro fagossoma, mas também tem um papel importante na saída eficiente de *L. monocytogenes* do vacúolo de dupla membrana, que vai conduzir à infecção célula a célula (Gedde *et al.*, 2000) tal como foi referido anteriormente.

#### 1.5.3.3. Fosfolipases

*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, produzem três enzimas diferentes com actividade de fosfolipase C (PLC), e relacionadas com a virulência. As proteínas PlcA e PlcB estão presentes em *L. monocytogenes*, e a proteína SmcL é específica de *L. ivanovii* (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001). As duas fosfolipases sintetizadas por *L. monocytogenes* são a PI-PLC, uma proteína de 33 kDa codificada pelo gene *plcA*, que está relacionada com a lise dos vacúolos e a PC-PLC, uma outra proteína com 29 kDa codificada pelo gene *plcB*, que se encontra associada à invasão célula a célula. A enzima PC-PLC danifica a membrana dos vacúolos de algumas células epiteliais o que, neste caso, pode conduzir a uma acção de substituição da enzima LLO (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.5.3.4. Proteína ActA

Uma vez no citoplasma, *L. monocytogenes* começa a sua multiplicação e a proteína de superfície ActA, proteína de 67 kDa codificada pelo gene *actA*, induz a polimerização das moléculas da actina globular obtendo-se filamentos de actina polimerizados. As células de *Listeria* movem-se com a ajuda desses filamentos até à membrana plasmática. Forma-se uma protuberância na membrana, passando o patógeno para a célula adjacente. Desta forma, *L. monocytogenes* invade o tecido celular sem ser exposta aos anticorpos ou a outras moléculas imunoactivas (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.5.3.5. PrfA uma proteína reguladora de transcrição

Os genes de LIPI-1, e alguns genes de outras subfamílias que codificam internalinas, são regulados pela proteína PrfA. Contudo, nem todos os genes responsáveis pela virulência são regulados por esta proteína, como por exemplo, o gene *SmaL* de *L. ivanovii* e os genes *inlB* e *inlGHE* de *L. monocytogenes*. Sabe-se também que a proteína PrfA regula negativamente alguns genes de *L. monocytogenes*, como o gene que medeia a resposta ao stress, *clpC*, e os genes associados à mobilidade, *motA* e *flaA* (revisto por Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

#### 1.5.3.6. p60

Outro gene virulento importante em *L. monocytogenes* codifica a proteína p60, a maior proteína extracelular de *L. monocytogenes*, com 60 kDa, que está associada à invasão de células fagocíticas não-profissionais. O gene que codifica a p60 é designado *iap* (invasion-associated protein). A transcrição de *iap* é independente de PrfA e a síntese desta proteína é controlada por um mecanismo de pós-transcrição.

#### 1.5.3.7. VirR

O gene *virR* codifica para um regulador putativo de resposta de um sistema de dois componentes. A deleção de *virR* diminui drasticamente a virulência em murinhos, bem como a invasão de culturas de linhas celulares. Utilizando uma abordagem transcriptómica, Mandin *et al.* (2005) identificaram 12 genes regulados por *virR*. Este gene parece, assim, controlar a virulência através de uma regulação global de modificações de componentes de superfície. Essas modificações podem afectar as interacções com as células hospedeiras, incluindo os componentes do sistema imunitário. A análise *in silico* dos promotores da

regulação de *virR* revelaram um local de consenso da ligação de VirR ao DNA e interações específicas entre a proteína VirR purificada e esta sequência de consenso. Com este estudo, estes autores evidenciaram a existência de um segundo regulão da virulência, depois de PrfA, em *L. monocytogenes*.

#### 1.5.3.8. Factor Sigma ( $\sigma$ )

Os factores sigma ( $\sigma$ ) constituem uma classe de subunidades de uma polimerase de RNA procariota.

*L. monocytogenes* apresenta cinco factores sigma.  $\sigma^A$  (sigma A),  $\sigma^B$  (sigma B),  $\sigma^L$  (sigma L),  $\sigma^C$  (sigma C) e  $\sigma^H$  (sigma H).  $\sigma^A$  codificada por *rpoD*, é um factor sigma genérico que regula a transcrição dos genes de expressão basal, enquanto os outros quatro são factores  $\sigma$  alternativos (Glaser *et al.*, 2001).

O gene que codifica  $\sigma^C$  só é encontrado nalgumas estirpes de *L. monocytogenes*, aquelas classificadas na linhagem II (serótipos 1/2a, 1/2c e 3a) (Zhang *et al.*, 2005).

O factor sigma B ( $\sigma^B$  ou SigB), que foi extensivamente estudado em *Bacillus subtilis*, é um regulador crítico da virulência em *Listeria*, uma vez que regula um número elevado de genes que foram identificados pela análise do seu transcrito (Kazmierczak *et al.*, 2005; Hain *et al.*, 2008; Raengpradub *et al.*, 2008). Os genes regulados por SigB incluem a internalina InlB.

O factor sigma B é codificado pelo gene *sigB*. A identificação do regulão  $\sigma^B$  em *L. monocytogenes*, combinado com a proteómica e as análises fenotípicas dos mutantes  $\sigma^B$ -nulos ( $\Delta sigB$ ), forneceram uma evidência considerável de que  $\sigma^B$  contribui crucialmente para a capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar e sobreviver, tanto em mamíferos como em condições de stresse encontradas noutros tipos de ambientes (Gray *et al.*, 2006).

O  $\sigma^B$  envolvido na resposta ao stresse foi identificado noutras bactérias Gram positivas, com conteúdo de G+C igualmente baixo. Em *L. monocytogenes*,  $\sigma^B$  contribui para a sobrevivência da célula sob condições de stresse, incluindo a exposição a pH baixo, stresse oxidativo, inanição de carbono e crescimento a baixas temperaturas (Wiedmann *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003; Moorhead e Dykes, 2004; Wemekamp-Kamphius *et al.*, 2004).

## 1.6. Métodos de avaliação da virulência

Apesar de *L. monocytogenes* ser isolada de diversos ambientes, incluindo alimentos e locais relacionados com a preparação dos mesmos, os surtos de listeriose são raros e esporádicos (Broomer *et al.*, 1986; McLauchlin, 1987). Este facto sugere que deve haver uma variação substancial na patogenicidade dos isolados de *L. monocytogenes* (Donald *et al.*, 1989).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a determinação da virulência de estirpes de *L. monocytogenes*, incluindo o teste de Anton, o teste fertilizante de Hen e os testes com animais imunocomprometidos ou imunocompetentes, sendo os murganhos os animais mais usados nestes tipo de testes (Brosch *et al.*, 1993; Hof *et al.*, 1994; Cabrita *et al.*, 2004). Ensaio com culturas de células animais também têm sido realizados com o mesmo objectivo (Roche *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2008). Marcadores genéticos e fenotípicos da virulência têm também sido usados para a caracterização de estirpes virulentas (Wernars *et al.*, 1992; Kerr *et al.*, 1995; Wiedmann *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2007).

### 1.6.1. Ensaio *in vivo*

Ensaio de virulência efectuados em pessoas, mesmo de uma forma voluntária, não são praticados, pois iriam levantar problemas de ordem ética e moral. Assim, são utilizados nos testes *in vivo* animais de laboratório (revisto por McLauchlin *et al.*, 2004). Os animais mais usados são os coelhos, os murganhos e, em menor escala, os ratos. Estes animais ou morrem no decurso dos ensaios, ou são mortos após a inoculação com a bactéria. Para a inoculação pode usar-se quer a via sistémica (intravenosa, intraperitoneal ou sub-cutânea) quer a via oral. A investigação da cinética de crescimento da bactéria nos tecidos do hospedeiro permitiu observar a presença das bactérias no fígado e no baço dos animais inoculados com *L. monocytogenes* ou com *L. ivanovii*. Todas as espécies não hemolíticas (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*) e pouco hemolíticas (*L. seeligeri*) são avirulentas nestes testes (Mainou-Fowler *et al.*, 1988).

O modelo que usa murganhos imunocomprometidos ("Immuno Compromised Mouse Model-ICMM"), em que se procede à inactivação dos macrófagos pela acção do carragénio, demonstra uma considerável diferença entre a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) das espécies virulentas e não virulentas (Stelma *et al.*, 1987; Tabouret *et al.*, 1991).

Alguns estudos efectuados com murganhos imunocomprometidos ou imunocompetentes, demonstraram que 10 a 20 % de estirpes isoladas a partir de alimentos são avirulentas ou hipovirulentas (Conner *et al.*, 1989; Tabouret *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 2003).

Os modelos experimentais mais usados que usam as vias intravenosa ou intraperitoneal, não traduzem a via de infecção normal nos humanos: isto é a via oral, pela ingestão de alimentos contaminados e a sua passagem pelo sistema gastro-intestinal (revisto por McLauchlin *et al.*, 2004). Apesar da infecção oral de murganhos traduzir a via natural de infecção humana, dá resultados menos reprodutíveis (Audurier *et al.*, 1980). Nestes animais, só uma pequena percentagem de células de *L. monocytogenes* passa a barreira intestinal. A razão pela qual isto acontece, deve-se ao facto de não existir nas células epiteliais dos murganhos, ao contrário do que acontece nas células epiteliais humanas, a proteína E-caderina, que pertence à família das moléculas de aderência e que é fundamental no processo de passagem da barreira intestinal. Actualmente, já é possível usar um novo modelo animal, constituído por murganhos transgénicos, cujos enterócitos são capazes de expressar E-caderina humana (revisto por Hamon *et al.*, 2006).

### 1.6.2 Ensaios *in vitro*

Estudos efectuados *in vitro*, utilizando culturas de células animais, revelaram-se muito úteis, para a diferenciação de estirpes de *Listeria* spp. patogénicas e não patogénicas (Farber e Speirs, 1987; Bhunia *et al.*, 1994). A patogenicidade de *L. monocytogenes* está directamente relacionada com a expressão dos seus genes virulentos (Cossart, 1995; Dramsi *et al.*, 1995) que, por sua vez, são responsáveis pela penetração, proliferação e disseminação da bactéria nas células do hospedeiro. No entanto, os ensaios *in vitro* não conseguem avaliar a acção de todos os genes virulentos, nos diferentes tipos de células.

Dependendo do objectivo em causa e variando o tempo de incubação e a concentração de gentamicina, quatro protocolos *in vitro* podem ser utilizados: protocolos de aderência, invasão, crescimento intracelular e invasão célula a célula, também conhecido por ensaio de formação de placas (PFA-plaque forming assay). (Roche *et al.*, 2008) (Fig 5).

Nestes ensaios, têm sido usadas, entre muitas outras, a linha celular Caco-2, cuja origem é de um adenocarcinoma humano, e a linha celular HT-29, de origem idêntica. A linha celular Caco-2, apresenta um aumento na taxa de multiplicação após a entrada de *L. monocytogenes* nas células epiteliais (Velge *et al.*, 1997). Ao contrário das Caco-2, e na presença de glucose, as células HT-29 apresentam uma taxa de proliferação constante e independente da infecção por *L. monocytogenes* (Zweibaum *et al.*, 1985).

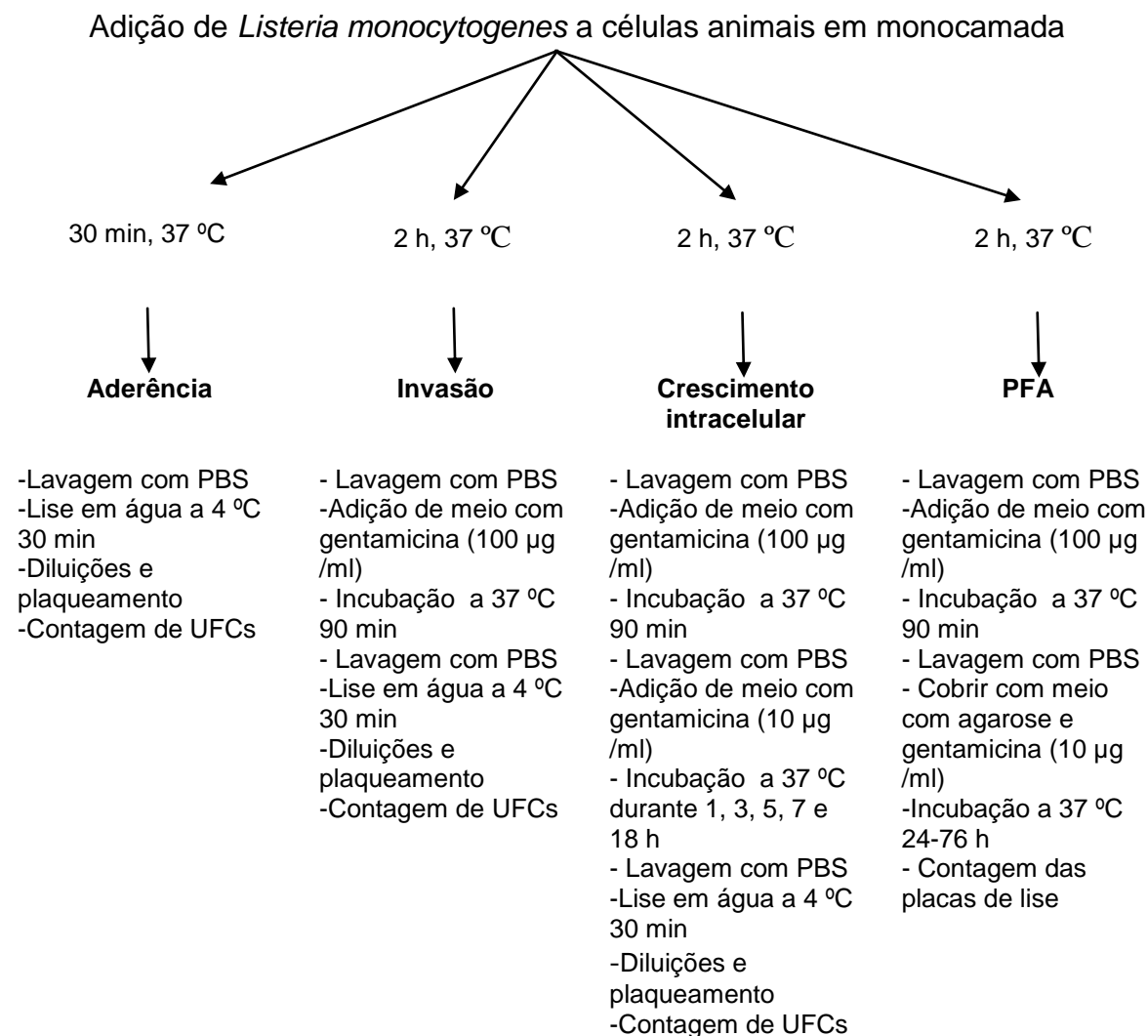


Fig.5 Protocolos de ensaios *in vitro*, mais usados na determinação da virulência de *L. monocytogenes* (adaptado de Roche *et al*, 2008).

## 1.7. Enquadramento do trabalho e objectivos

Como já foi referido, *L. monocytogenes* é capaz de provocar graves casos de listeriose, esporádicos e epidémicos, em humanos e animais. De acordo com o novo regulamento (CE) Nº 1441/2007, de 5 de Dezembro de 2007 (Anónimo, 2007) relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, há três categorias de alimentos especificamente relacionadas com o microrganismo *L. monocytogenes*. A primeira categoria engloba alimentos destinados a latentes e alimentos prontos para consumo, destinados a fins medicinais específicos. Neste caso, o critério é de ausência em 25 g. A segunda categoria engloba todos os alimentos prontos para consumo, susceptíveis de permitir o

crescimento de *L. monocytogenes*. Esta categoria é subdividida de acordo com a fase em que o critério se aplica. Assim, os produtos colocados no mercado, e durante o seu período de vida útil não devem ter mais de 100 UFC g<sup>-1</sup>. Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu, o limite deve ser de ausência em 25 g de produto. A terceira categoria de alimentos, engloba alimentos prontos para consumo, não susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*. Neste caso o limite permitido é inferior ou igual 100 UFC g<sup>-1</sup>. Na primeira e terceira categoria, a fase em que o critério se aplica é a dos produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil.

Habitualmente, no que diz respeito ao controlo de alimentos, todos os isolados de *L. monocytogenes* são considerados virulentos. Contudo, algumas estirpes podem perder certas características virulentas (Hof *et al.*, 1994). A indústria alimentar tem, por isso mesmo, reclamado uma mudança para critérios legislativos baseados no risco real para a Saúde Pública. Parece pois indispensável a implementação e a validação de testes rápidos, de avaliação da virulência de isolados alimentares de *L. monocytogenes*.

Como já foi dito, esta bactéria é considerada psicrotolerante, uma vez que consegue crescer a temperaturas de refrigeração. Por este motivo, após a contaminação inicial dos alimentos, a sua presença pode ser significativa, particularmente em alimentos refrigerados e RTE, desde que os factores intrínsecos e extrínsecos permitam a sua sobrevivência e/ou o seu crescimento.

O efeito das baixas temperaturas na patogenicidade da bactéria assume um interesse particular relativamente à Segurança Microbiológica dos alimentos, uma vez que, na cadeia alimentar, a rede de frio é cada vez mais extensa e os tempos de armazenagem dos alimentos nestas condições podem ser muito prolongados.

Com o objectivo de avaliar o efeito do tempo (durante os períodos de 1, 7 e 30 dias a 7 ° C) na virulência inicial de isolados de *L. monocytogenes*, foi estudado neste trabalho, um conjunto de 17 isolados, de diversas origens. Todos os isolados, incluindo as estirpes tipo, foram caracterizados por PFGE e a sua patogenicidade foi avaliada recorrendo ao ensaio de formação de placas de lise (PFA). Neste mesmo estudo foram ainda incluídas duas estirpes de referência para a virulência (EGDe e 442), também utilizadas em trabalhos anteriores.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estirpes bacterianas e linha celular animal

As estirpes de *L. monocytogenes*, descritas no Quadro 1, foram usadas na infecção da linha celular animal HT-29 (ECACC - *European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK). Estas células, inicialmente isoladas a partir de um adenocarcinoma humano, foram usadas entre as passagens 27 e 33.

As estirpes bacterianas utilizadas, encontravam-se conservadas a - 80 °C em meio de cultura TSB-YE com 20 % (v/v) de glicerol. Foi constituída uma colecção de trabalho em tubo inoculado por picada central, conservada em meio de TSA-YE semi-sólido a 4 °C. A pureza das culturas foi confirmada através de inoculação em placas de agar de sangue para confirmação da hemólise, e em placas do meio CHROMagar Listeria.

No grupo dos 17 isolados, incluíam-se isolados com as seguintes origens: cinco de alimentos congelados, três de alimentos refrigerados, cinco de refrigerados RTE, um de RTE, dois de humanos e um do ambiente de uma queijaria.

**Quadro 1** - Estirpes de *L. monocytogenes* utilizadas

Referência (nº CBISA)	Serótipo / Grupo multiplex PCR	Origem / Fonte
3001	4b	CECT 4032
3002	1/2c	CECT 911
3003	4a	CECT 934
3004	1/2b	CECT 936
3005	3b	CECT 937
3006	4c	CIP 78.39
3007	1/2a	CIP 104794
3992	1/2a	Animal / (estirpe EGDe) (Roche <i>et al.</i> , 2005)
3993	4d/4e	Produto alimentar/ (estirpe 442) (Roche <i>et al.</i> , 2005)
3046	1/2a	Leite cru / Cabrita <i>et al.</i> , 2004
3049	1/2a	Leite cru / Cabrita <i>et al.</i> , 2004
3077	4b	Queijo de ovelha / Leite <i>et al.</i> , 2006
3130	1/2a	Queijo de ovelha Leite <i>et al.</i> , 2006
3172	4b	Escovas do lavador de queijo Leite <i>et al.</i> , 2006
3219	4b	Queijo de ovelha Leite <i>et al.</i> , 2006
3850	4b	Humano Leite <i>et al.</i> , 2006
3857	4b	Humano Leite <i>et al.</i> , 2006
4003	1/2c - 3c	Hamburguer (sem tempero)
4010	4b - 4d - 4e	Sandes americana
4011	1/2b - 3b	Sandes americana
4028	4b - 4d - 4e	Bife de suíno
4032	4b - 4d - 4e	Bacalhau
4079	1/2b - 3b	Ervilhas com ovos escalfados e chouriço (RTE)
4082	1/2a - 3a	Hamburguer de aves sem tempero (congelado)
4086	4b - 4d - 4e	Filete de Palmeta com pele (congelado)
4089	1/2a - 3a	Piza de atum

CECT-Colección Española de Cultivos Tipo

INRA-Institut National de la Recherche Agronomique

CBISA-Coleção de Bactérias do ISA- Instituto Superior de Agronomia

CIP- Collection de l'Institut Pasteur

## 2.2. Soluções para o ensaio de PFA

As soluções utilizadas, para os ensaios de formação de placas e manutenção da linha celular usada, a seguir descritas, foram as seguintes: solução de tripsina-versène, solução de soro fetal bovino inativado, solução de soro fisiológico tamponado, solução mistura de penicilina e estreptomicina, solução de gentamicina, solução de L-glutamina e solução corante de azul de tripano.

### 2.2.1. Tripsina-Versène (ATV)

Componentes	Concentração (g/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	8,0
Cloreto de potássio (KCl)	1,0
Glucose hidratada ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )	1,1
Hidrogeno carbonato de sódio ( $NaHCO_3$ )	0,58
EDTA hidratado	0,2
Tripsina (Gibco/InVitrogen)	2,0

Após a dissolução de todos os componentes, acertou-se o pH a 7,1-7,2. A esterilização foi efectuada por filtração com membrana, de 0,22  $\mu m$ . O ATV foi armazenado a -20 °C.

### 2.2.2. Inactivação do soro fetal bovino (SFB)

Descongelou-se o SFB (Gibco/InVitrogen Paisley, Grã-Bretanha) durante a noite em frigorífico. Para a descongelação ser completa, colocou-se o soro em banho de água a 37 °C. Depois de completamente descongelado, manteve-se à mesma temperatura mais 15 minutos. Aumentou-se a temperatura do banho de água para 56 °C e, após atingida essa temperatura, colocou-se o soro no banho por 35 minutos. Durante este período, agitou-se o frasco, que continha o soro, de 10 em 10 minutos. Depois de arrefecido à temperatura ambiente, distribuiu-se em alíquotas de 50 ml. O soro foi armazenado a -20 °C.

### 2.2.3 Soro fisiológico tamponado

Componentes	Concentração (g/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5
Di-hidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0
Hidrogeno fosfato di-potássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2,0

Após a dissolução de todos os componentes, acertou-se o pH a 6,85. A esterilização foi efectuada, por calor húmido, em autoclave, a 121 °C durante 30 minutos.

### 2.2.4. Solução mistura de penicilina e estreptomicina

Depois de preparada a solução de penicilina (Sigma, St. Louis, USA) a  $2 \times 10^4$  UI  $\text{ml}^{-1}$  e de estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) a 20 mg  $\text{ml}^{-1}$ , procedeu-se à sua esterilização por filtração em membrana estéril, de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. A solução foi distribuída em alíquotas de 2 ml e armazenada a – 20 °C.

### 2.2.5. Solução de gentamicina

A solução de gentamicina (Sigma, St. Louis, USA) 50 mg  $\text{ml}^{-1}$  foi esterilizada por filtração como descrito no ponto anterior, distribuída em alíquotas de 2 ml e armazenada à temperatura de refrigeração (2-8 °C).

### 2.2.6. Solução de L-glutamina

Após a preparação da solução de L-glutamina (Sigma, St. Louis, USA) a 200 mM, a mesma foi esterilizada por filtração, nas mesmas condições das soluções anteriores. A solução foi distribuída em alíquotas de 2 ml e armazenada a – 20 °C.

### 2.2.7. Solução corante de azul de tripano

Fez-se uma solução aquosa de azul de tripano (Riedel-de Haën, Seelz, Alemanha) 0,4 % (m/v) com água destilada. A solução foi esterilizada a 121 °C, durante 20 minutos, e armazenada à temperatura ambiente.

## 2.3. Meios de cultura para o ensaio de PFA

Para a confirmação da pureza das estirpes de *L. monocytogenes*, foram utilizados os meios: CHROMagar Listeria e agar de sangue suplementado com 5 % (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado.

No crescimento para os ensaios de infecção utilizou-se meio TSA-YE, preparado com TSB, suplementado com extracto de levedura e adicionando agar.

Para a manutenção e ensaios de infecção das células animais o meio utilizado foi o D-MEM.

A preparação dos meios acima referidos, é descrita a seguir.

### 2.3.1. Meios sólidos

#### 2.3.1.1. CHROMagar Listeria

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	26
Extracto de levedura	8
Factores de crescimento	4,2
Cloreto de sódio	5
Fosfato di-sódico	2,5
Cloreto de lítio	10
X-glucose	0,05
Substrato L.M.	20 ml
Ácido nalidílico	15
Ceftazidina	0,02
Cicloheximida	0,1
Polimixina B	100 000 UI
Agar	15

O meio de cultura CHROMagar é comercializado desidratado, pela empresa CHROMagar (CHROMagar, Paris, França) na forma de um meio base e de um suplemento. Depois do meio base ter sido esterilizado a 121 °C durante 20 minutos e arrefecido a 60 °C, adicionou-se o suplemento previamente hidratado de acordo com as instruções do

fabricante. O meio de cultura depois de preparado foi distribuído em caixas de Petri e armazenado a 2 - 8 °C até sua utilização, por um período inferior a 15 dias.

#### 2.3.1.2. Meio de cultura de agar de sangue

Este meio foi preparado, colocando uma primeira camada, com 12 ml de agar nutritivo (Oxoid, Hampshire, England) em caixa de Petri. Após solidificação desta camada, adicionou-se 18 ml de agar de sangue (Oxoid, Hampshire, England) suplementado com 5% (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado (Probiológica, Belas, Portugal).

#### 2.3.1.3. Meio TSA-YE

Na preparação deste meio TSA-YE utilizou-se o meio TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) suplementado com 6 g l<sup>-1</sup> de extracto de levedura (Oxoid, Hampshire, England) e 18 g l<sup>-1</sup> de agar. O meio foi esterilizado a 121 °C, 20 minutos. O meio, depois de distribuído em caixas de Petri, foi armazenado à temperatura de 2 - 8 °C.

### 2.3.2. Meio líquido D-MEM

O meio de cultura utilizado nos ensaios de formação de placas e manutenção da linha celular usada foi o seguinte:

Componentes	Concentração (mg/L)
Aminoácidos	
Glicina	30
L-Arginina HCL	84
L-Cistina 2HCl	63
L-Glutamina	584
L-Histidina HCL-H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
L-Lisina HCL	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptofano	16
L-Tirosina 2Na.2H <sub>2</sub> O	104
L-Valina	94
Vitaminas	
Cloreto de colina	4
Pantotenato D-Cálcico	4
Ácido fólico	4
i-Inositol	7,2
Niacinamida	4
Piridoxal HCL	4
Riboflavina	0,4
Tiamina HCL	4
Sais inorgânicos	
Cloreto de cálcio	200
Nitrato de ferro	0,1
Sulfato de magnésio	97,67
Cloreto de potássio	400
Cloreto de sódio	6400
Fosfato de sódio	125
Outros componentes	
D-Glucose	4500
Vermelho de fenol	15

Ao meio de cultura D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media: high glucose, with L-glutamine, without sodium pyruvate, sodium bicarbonate) (Gibco/Invitrogen, Paisley, Gra Bretanha) adicionou-se 3,7 g l<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio e acertou-se o pH a 7,2 - 7,3. A esterilização foi efectuada por filtração em membrana estéril, com diâmetro de 0,22 µm. O meio foi conservado, em frigorífico, à temperatura de refrigeração (2 – 8 °C).

## 2.4. Soluções utilizadas para o PFGE

### 2.4.1. PFGE para *Listeria monocytogenes*

#### 2.4.1.1. Solução tampão de equilíbrio da enzima

Reagentes	Quantidade
Tampão da enzima ( <i>Ascl</i> ou <i>Apal</i> )	15 µl
Água milliq esterilizada	135 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o número de isolados a testar (+ 1).

#### Tampões enzima utilizados:

NE buffer 4 (tampão para a enzima *Ascl*). (New England Biolabs, Massachusetts, USA).

Buffer B + (tampão para a enzima *Apal*). (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

#### 2.4.1.2. N-Laurilsarcosina 10 % (m/v)

Reagentes	Quantidade
N-Laurilsarcosina	10 g
Água milliq esterilizada	Perfazer até 100 ml

Dissolveu-se o reagente em água ligeiramente aquecida (aprox. 37 °C).

#### 2.4.1.3. Tris-EDTA-N-Laurilsarcosina

Reagentes	Quantidade
Tris 1 M pH 8	50 ml
EDTA 0,5 M pH 8	100 ml
N-Lauroisarcisina 10 % (m/v)	100 ml
Água milliq esterilizada	750 ml

Esterilizou-se 15 min a 121 °C.



## 2.4.1.4. TBE

Reagentes	Quantidade
<b>TBE 1 X</b>	
TBE 10 X	200 ml
Água milliq esterilizada	Perfazer até 2000 ml
<b>TBE 0.5 X</b>	
TBE 10 X	100 ml
Água milliq esterilizada	Perfazer até 2000 ml

Esterilizou-se 15 min a 121 ° C.  
(Guardou-se à temperatura ambiente ou refrigerado).

## 2.4.1.5. Soluções de SeaKem Gold agarose

Reagentes	Quantidade
<b>Agarose a 1,2 % (m/v)</b>	
SeaKem Gold (Lonza, Rockland, EUA)	0,06 g
Água milliq esterilizada	5 ml
<b>Agarose a 1 % (m/v)</b>	
SeaKem Gold	2 g
TBE 0,5 X	200 ml

Fundiu-se a agarose sem deixar ferver.  
Deixou-se arrefecer até 55 °C, antes de utilizar.

## 2.4.1.6. Solução de lise

Reagentes	Quantidade
Tris 50 mM pH 8 EDTA 50 mM pH 8 N-Laurilsarcosina 1 %	4 ml
Proteinase K 20 mg / ml (Eurobio, Les Ullis, França)	30 µl

Preparou-se com antecedência:

Tris-EDAT-N Laurylsarcosine (descrito anteriormente).

Só, imediatamente antes, da utilização desta solução, é que se adiciona a proteinase K.

## 2.4.1.7. TE pH 8

Reagentes	Quantidade
Tris 1 M pH 8	5 ml
EDTA 0,5 M pH 8	1 ml
Água milliq esterilizada	Perfazer para 500 ml

Esterilizou-se a 15 min a 121 ° C.

## 2.4.1.8. Lisozima 10 mg / ml

Reagentes	Quantidade
Lisozima (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha)	100 mg
Água milliq esterilizada	Perfazer para 10 ml

Guardou-se em aliquotas de 1 ml, a – 20 ° C.

## 2.4.1.9.SSP

Reagentes	Quantidade
SDS 10 % (m/v)	30 µl
SeaKem Gold agarose 1,2 % (m/v)	267 µl
Proteinase K 20 mg / ml	3 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o número de isolados a testar (+ 2).

Mediu-se o SDS e colocou-se no banho a 55 °C

Adicionou-se a agarose.

Homogeneizou-se sem agitar e foi novamente a 55 °C.

Adicionou-se a proteinase K, imediatamente antes da utilização.

Homogeneizou-se sem agitar e manteve-se a 55 °C.

2.4.1.10. Solução de restrição para a enzima *Ascl*

Reagentes	Quantidade
NE buffer 4 (New England Biolabs, Massachusetts, USA)	15 µl
Água milliQ esterilizada	134 µl
<i>Ascl</i> 10 U / µl (New England Biolabs, Massachusetts, USA)	1 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o número de isolados a testar (+ 1).

Adicionou-se a enzima *Ascl*, imediatamente antes da sua utilização.

Incubou-se a 37 °C durante 12 h.

2.4.1.11. Solução de restrição para a enzima *Apal*

Reagentes	Quantidade
Buffer B+ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	15 µl
Água milliQ esterilizada	134 µl
<i>Apal</i> 10 U / µl (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	3 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o nº de isolados a testar (+ 1).

Adicionou-se a enzima *Apal*, imediatamente antes da utilização.

Incubou-se a 30 °C durante 12 h.

2.4.2 ***PFGE para Salmonella Braenderup (marcador)***

## 2.4.2.1. Solução de lise

Reagentes	Quantidade
TE pH 8-N-Laurylsarcosine 1 % (m/v)	5 ml
Proteinase K (20 mg / ml)	25 µl

Preparou-se com antecedência o: TE pH 8-N-Laurilsarcosina 1 % (m/v)

## 2.4.2.2. Solução tampão de equilíbrio da enzima

Reagentes	Quantidade
Tampão enzima 10X	20 µl
Água milliQ esterilizada	180 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o nº de isolados a testar (+ 1).

## 2.4.2.3. Suspensão tampão

Reagentes	Quantidade
Tris 1 M pH 8	10 ml
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml
Água milliQ esterilizada	70 ml

Esterilizou-se 15 min a 121 ° C.  
Guardou-se à temperatura ambiente.

## 2.4.2.4. SDS 1 % (m/v) SeaKem Gold agarose 1 % (m/v)

Reagentes	Quantidade
SeaKem Gold agarose	0,5 g
SDS 20 % (m/v)	2,5 ml
TE	47 ml

Juntou-se a agarose e o TE num tubo Falcon, agitou-se para que a agarose ficasse em suspensão.

Aqueceu-se em microondas sem deixar ferver, agitando-se regularmente até completa dissolução da agarose.

Deixou-se arrefecer em banho de água a 54 ° C.

Adicionou-se o SDS.

Deixou-se a solução em banho de água a 54° C, até sua utilização.

#### 2.4.2.5. Solução de restrição para a enzima *Xba*I

Reagentes	Quantidade
Tampão enzima 10X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	20 µl
Água milliQ esterilizada	179 µl
Enzima <i>Xba</i> I 10 U / µl (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	1 µl

Preparou-se a quantidade necessária para o nº de isolados a testar + 1.

Adicionou-se a enzima *Xba*I, imediatamente antes da utilização.

Incubou-se a 37 °C durante 12 h.

## 2.5. Procedimento para a subtipagem molecular de *Listeria monocytogenes*

### 2.5.1. Acerto da concentração das suspensões bacterianas

A partir das placas de TSA-YE, inoculadas no dia anterior, ajustou-se a concentração das suspensões, de cada estirpe, em 3 ml de TE ou em solução de suspensão (no caso de *Salmonella*), em *cuvette* de espectrofotômetro (Bausch & Lomb, New York, USA), a uma  $A_{610\text{ nm}}=1,25$  a 1,35.

### 2.5.2. Preparação do DNA de *Salmonella enterica*, serovar Braenderup H9812 (marcador molecular)

A partir da suspensão bacteriana, preparada anteriormente em *cuvette*, retirou-se 200 µl de suspensão, para um microtubo. Adicionou-se 200 µl de SSP (agarose SeaKem Gold (1,0% m/v) SDS (1% m/v) e 10 µl de Proteinase K (20 mg/ml)), mantida a 54 °C ± 1 °C.

Distribuiu-se rapidamente, aproximadamente, 110 µl da mistura obtida, por moldes reutilizáveis (Bio-Rad, Hercules, USA) e deixou-se solidificar à temperatura ambiente, durante 5 a 10 minutos.

### 2.5.3.Preparação do DNA de *L. monocytogenes*

A partir da suspensão bacteriana, preparada anteriormente em *cuvette*, retirou-se 240 µl de suspensão, para um microtubo. Adicionou-se 60 µl de lizosima (10 mg / ml). Incubou-se em banho de água, durante 10 minutos a 37 °C. Adicionou-se 300 µl de SSP mantida a 54 °C  $\pm$  1 °C). Distribuiu-se rapidamente aproximadamente, 110 µl da mistura, por moldes reutilizáveis e deixou-se solidificar à temperatura ambiente, durante 5 a 10 minutos.

### 2.5.4.Lavagens

Transferiram-se os cubos de agarose (*plugs*) de cada estirpe, para tubos Falcon de 50 ml contendo 4 ml de solução de lise (Tris 50 mM (pH 8), EDTA 50 mM (pH 8), Sarkosyl (1 % m/v), Proteinase K (20 mg/ml)). Incubaram-se os tubos, durante 2 horas a 54 °C, em banho de água com agitação de 85 rpm.

Findo esse tempo, removeu-se o tampão de lise e fizeram-se duas lavagens nas mesmas condições de temperatura e de agitação, durante 10 minutos. No caso dos cubos de *Salmonella*, o tempo foi de 15 minutos. Seguiu-se outro período de lavagens, desta vez quatro lavagens nas mesmas condições, mas durante 15 minutos cada e com tampão TE pré-aquecido a 54 °C.

### 2.5.5. Reacções de restrição

As reacções de restrição das amostras de DNA de *L. monocytogenes* com a enzima *Apal* e com a enzima *Ascl*, em separado, foram efectuadas com ½ cubo (*plug*) num volume final de 150 µL, de acordo com o fornecedor das enzimas. Para a enzima *Ascl* usou-se 10 U e para a enzima *Apal* usou-se também 10 U. As reacções decorreram durante cerca de 12 horas (durante a noite), a 37° C e a 30° C, para as enzimas *Ascl* e *Apal*, respectivamente.

A restrição das amostras de DNA de *Salmonella enterica* (marcador molecular) com a enzima *XbaI* realizou-se de forma semelhante, utilizando 10 U da enzima, durante cerca de 12 horas, a 37 °C.

### 2.5.6. Electroforese em campo pulsado

Os fragmentos de macrorestrição obtidos foram resolvidos através de electroforese de campo pulsado (PFGE). As amostras obtidas, depois das restrições, foram aplicadas num gel de agarose (SeaKem Gold) a 1 % (m/v) em tampão TBE 0,5 X. A corrida electroforética foi realizada em tampão TBE 0,5 X, a 14 °C, durante 22 h a 6 V cm<sup>-1</sup>, com o

tempo de impulso inicial de 4 s e final de 40 s, ângulo de 120°, num sistema CHEF DR II (Bio-Rad, Hercules, USA). A bomba foi regulada para 70 (ca. 0,75 l/min).

### 2.5.7. Aquisição da imagem do gel

Terminada a corrida, o gel foi corado por imersão numa solução de brometo de etídeo (10 µg/mL), durante 30 minutos, seguido de uma lavagem em água bidestilada durante 15 a 30 minutos. A imagem do gel (formato tiff), foi adquirida pelo sistema Bio-Rad Gel Doc 2000™ (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milão, Itália).

A determinação aproximada das dimensões dos fragmentos de macrorestrição foi efectuada por comparação com a mobilidade electroforética do padrão de referência, DNA de *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 digerido com a enzima *Xba*I.

### 2.5.8. Análise dos resultados do PFGE

De modo a avaliar o grau de afinidade genómica entre os isolados de *L. monocytogenes* (incluindo seis estirpes de referência para os serovares 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4b), procedeu-se à comparação dos perfis de macrorestrição obtidos, com recurso ao programa Gel Compar II versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os níveis de similaridade foram baseados no coeficiente de correlação de Dice. O dendrograma foi obtido utilizando o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA - *Unweighted-Pair Group Matching Algorithm*) com uma tolerância de 1,50% e uma optimização de 1,50%, como recomendado por Martin *et al.* (2006).

Para avaliar a eficácia do ajustamento do dendrograma obtido, aos dados iniciais, foi calculado o valor do coeficiente de correlação cofenética -  $\rho$  (coeficiente de correlação linear entre os pares de coeficientes de semelhança correspondentes).

O poder discriminante do PFGE, que consiste na capacidade do método para distinguir estirpes diferentes, foi determinado, como descrito por Hunter e Gaston (1998), utilizando o índice de discriminação de Simpson (SID) expresso como uma percentagem.

## 2.6. Manutenção da linha celular animal

As células animais HT-29 foram mantidas, em frasco de 75 cm<sup>2</sup> (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Bélgica) com meio de cultura completo D-MEM isto é, suplementado com 10 % (v/v) de SFB, 2 mM de L- glutamina, 100 UI ml<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina. As células foram incubadas a 37 °C, em estufa (Shel lab, Oregon, USA) com 90 % de humidade e 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> em ar. A manutenção da linha celular foi feita semanalmente, começando por se fazer a tripsinização das células. Três dias depois, fez-se

a substituição do meio de cultura completo D-MEM, pelo mesmo meio de cultura fresco. Quatro dias depois, voltou-se a fazer nova tripsinização.

### 2.6.1. Procedimento para a tripsinização da linha celular HT-29

Observou-se o tapete celular ao microscópio invertido (Leica, Wetzlar, Alemanha). Quando este apresentava uma confluência elevada (elevada densidade) procedia-se à sua tripsinização.

Procedeu-se à eliminação do meio de cultura contido no frasco onde cresceram as células. Lavou-se o tapete celular com 2 a 3 ml de soro fisiológico tamponado, retirou-se o soro e adicionou-se o mesmo volume de ATV, que foi também rejeitado, de seguida.

Adicionou-se 4 ml de ATV e seguiu-se um período de incubação de 15 minutos a 37 °C em estufa com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> em ar. Ao fim desse tempo, retirou-se o aglomerado de células para um tubo cónico de 50 ml (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Belgica), com 4 ml de SFB, lavou-se o frasco com 8 ml de soro fisiológico tamponado que se adicionou ao mesmo tubo cónico de 50 ml, lavou-se ainda o frasco com mais 1 ml de soro fisiológico que se adicionou também ao mesmo tubo.

As células contidas no tubo foram centrifugadas a 190 g durante 10 minutos, a 20 °C, (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Findo esse tempo, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 2,7 ml de meio de cultura D-MEM completo. Depois de homogeneizado, transferiu-se 1 ml desta suspensão para um novo frasco de 75 cm<sup>2</sup>, que já continha 24 ml de meio D-MEM completo. A cultura celular foi colocada a incubar nas condições anteriormente descritas.

### 2.6.2. Preparação do ensaio de infecção

A cultura de células animais usada nos ensaios de infecção foi preparada 3 dias antes do ensaio. Depois de se proceder à tripsinização das células animais, reservou-se um tubo cónico com o sedimento obtido, depois da centrifugação, e ressuspendeu-se o mesmo em 5 ml de meio de cultura D-MEM completo, mas sem antibióticos.

Depois de homogeneizado, preparou-se uma mistura de 50 µl de suspensão celular e 50 µl do corante azul de tripano. Fez-se a contagem do número de células viáveis (não coradas) em câmara de hemocitómetro (Neubauer, W-Germany) recorrendo para isso a microscópio invertido (objectiva de ×10).

Inocularam-se, então, cada um dos 96 poços da placa (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) com 100 µl de suspensão de células animais com uma concentração de  $3,2 \times 10^5$



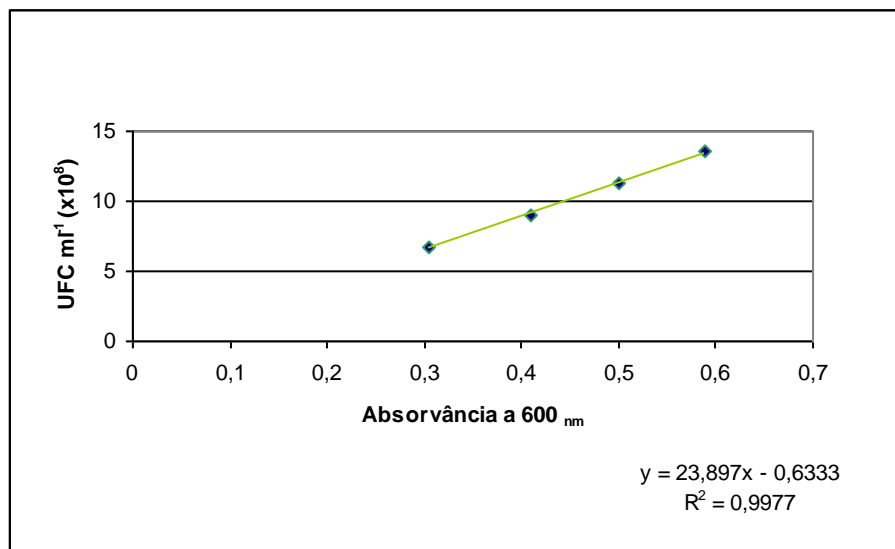
células  $\text{ml}^{-1}$ . Os poços exteriores da placa foram adicionados de 100  $\mu\text{l}$  de soro fisiológico, para minimizar a evaporação.

Incubou-se em estufa com 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  em ar, a 37 °C durante 3 dias. Passado esse período substituiu-se o meio de cultura DMEM completo pelo mesmo meio, desta vez sem antibióticos. Voltou-se a incubar nas mesmas condições, por mais 24 h.

### 2.6.3. Ensaio de formação de placas (Plaque Forming Assay-PFA)

Na véspera do ensaio de infecção inoculou-se, por riscado, cada estirpe, em placa de TSA-YE e incubou-se a 37 °C, durante a noite. No dia seguinte, dia do ensaio, utilizou-se a curva de calibração a seguir descrita, para ajustar a concentração das suspensões de cada estirpe a  $8 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  em soro fisiológico tamponado. Em todos os ensaios realizados foram usadas, como referências, as estirpes CBISA 3992 (EGDe) e CBISA 3993 (442) respectivamente virulenta e de baixa virulência.

### 2.6.4. Recta de calibração ( $A_{600 \text{ nm}}$ / UFC $\text{ml}^{-1}$ )



**Figura 6** - Recta de calibração ( $A_{600 \text{ nm}}$  / UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) para *L. monocytogenes* CBISA 3001

A figura 6 representa a recta de calibração ( $A_{600 \text{ nm}}$  / UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) para a estirpe 3001, em soro fisiológico tamponado. Os valores de absorvância das suspensões celulares foram determinados utilizando um espectrofotómetro (Bausch & Lomb, New York, USA).

Com a equação da recta obtida determina-se para um determinado valor de  $A_{600 \text{ nm}}$  o valor correspondente em UFC  $\text{ml}^{-1}$ .

Por exemplo: a um valor de  $A_{600 \text{ nm}} = 0,4$  corresponde a um valor de  $8,9 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$

### 2.6.5. Preparação das diluições decimais das suspensões bacterianas para os ensaios de refrigeração

Depois de preparadas as suspensões bacterianas, procedeu-se à realização das diluições decimais das mesmas, usando soro fisiológico tamponado, até à concentração de  $8 \times 10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>, em 500 µl de volume final. As diluições foram realizadas em triplicado, para cada tempo de incubação, à temperatura de 10 °C: zero, um, sete e trinta dias.

No final de cada período de incubação, adicionou-se a cada tubo 500 µl de meio de cultura DMEM completo 2 x, imediatamente antes de se proceder à infecção do tapete celular.

A confirmação do número de células viáveis nos inóculos bacterianos foi feita, em duplicado a partir da suspensão mais diluída, por inoculação de placas de TSA-YE com 100 µl de inóculo seguida de espalhamento, ou por deposição de gota (*spot*) com 25 µl de inóculo.

### 2.6.6. Infecção do tapete celular

Antes de iniciar a deposição das diferentes concentrações bacterianas nos poços, fez-se uma aspiração do meio de cultura existente em todos os poços. Para cada estirpe, colocou-se 25 µl de cada uma das seis diluições consecutivas, de modo a se obter de 2 a 7 log UFC de *Listeria* em cada dois poços, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C na estufa com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> em ar, durante duas horas.

### 2.6.7. Eliminação das células extracelulares

Após 2 horas de infecção, eliminou-se o conteúdo dos poços e adicionou-se 100 µl de meio de cultura com gentamicina, na concentração de 100 µg ml<sup>-1</sup>. Voltou-se a incubar nas mesmas condições, por um período de 1 hora e 30 minutos.

### 2.6.8. Deposição de agarose

Preparou-se o mesmo meio de cultura, mas desta vez com gentamicina na concentração de 10 µg ml<sup>-1</sup>. Juntou-se 5,6 ml de agarose (Gibco/InVitrogen, Rockland, USA) a 2,5 % (m/v) a 24,4 ml de meio de cultura. Depois de aspirar previamente o conteúdo dos poços, colocou-se 100 µl da mistura (com a concentração final de 0,5 % de agarose) em cada um. Depois de solidificado, adicionou-se em cada poço 50 µl do mesmo meio, mas desta vez sem a agarose. A incubação foi feita nas mesmas condições, durante 24 h ou 48 h caso não houvesse formação de placas de lise nas primeiras 24 h.

### 2.6.9. Contagem das placas de lise e expressão e análise estatística dos resultados do PFA

Findo o período de incubação, contou-se o número de placas de lise com o auxílio do microscópio invertido com a objectiva  $\times 4$ .

O potencial virulento das estirpes testadas foi expresso como a média dos logaritmos decimais (log) do número de placas formadas, em duplicado, em três ensaios independentes.

A análise de variância dos resultados das contagens das placas foi realizada com recurso ao programa *Statistica*<sup>TM</sup>, versão 5, da Statsoft, EUA, utilizando o teste de Scheffe.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Subtipificação dos isolados de *L. monocytogenes*

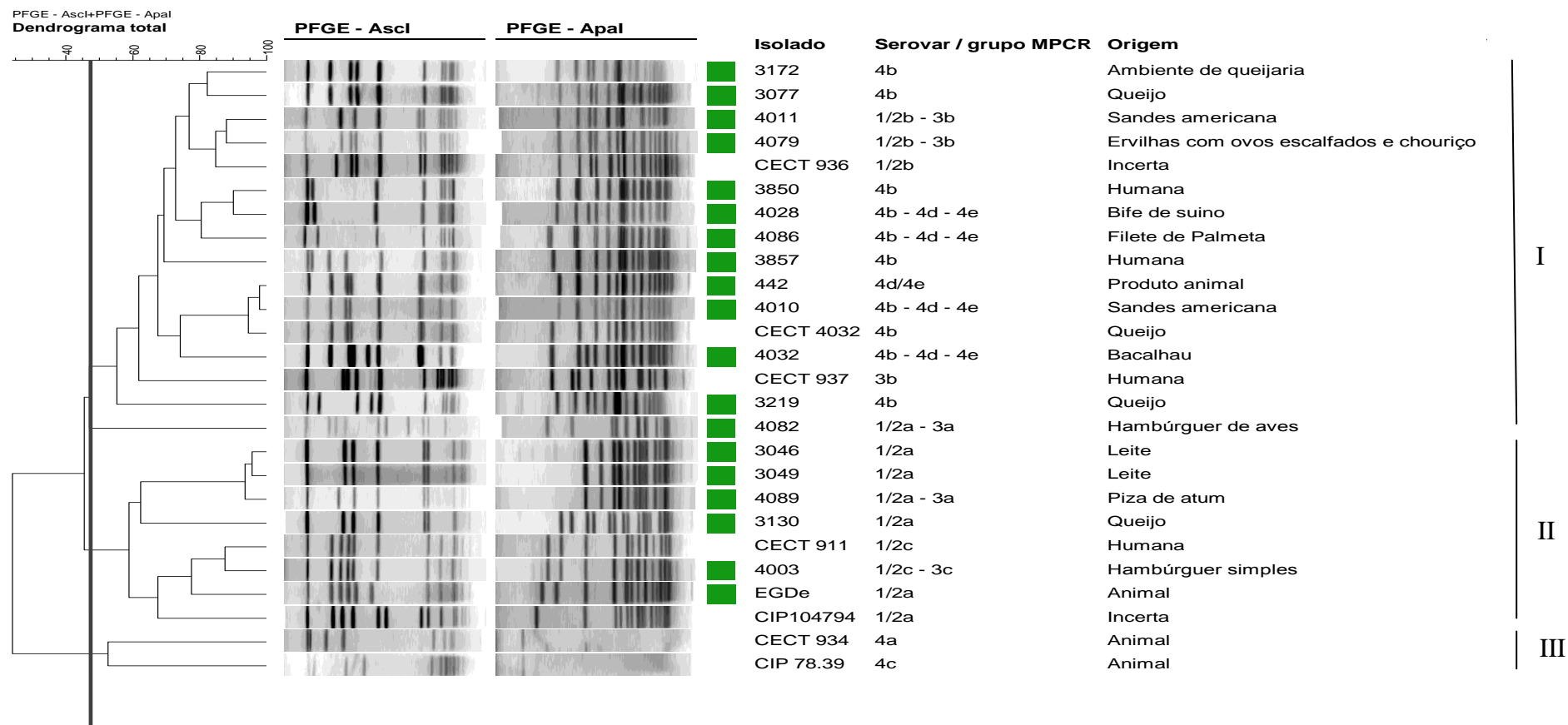
A relação entre as estirpes de *L. monocytogenes* estudadas, baseada nos seus perfis PFGE, por combinação das enzimas *Apal* e *Ascl*, está assinalada no dendrograma da Fig. 7. Para avaliar a eficácia do ajustamento do dendrograma aos dados iniciais, foi calculado o valor do coeficiente de correlação cofenética ( $\rho$ ). Neste caso, este valor foi igual a 0,90. Habitualmente, este coeficiente apresenta valores entre 0,60 e 0,95 e valores superiores a 0,80 são considerados aceitáveis (Priest e Austin, 1993).

A partir dos resultados obtidos com experiências em duplicado, para a definição de um pulsotipo, foi estabelecida uma linha de corte do dendrograma (*cut-off*) igual a 0,95 de semelhança. A macrorestrição do DNA com a enzima *Ascl* diferenciou os 26 isolados em 20 perfis diferentes. Quando se procedeu à digestão do DNA com a enzima *Apal* obtiveram-se 24 tipos PFGE.

O poder discriminante do PFGE, que consiste na capacidade do método para distinguir estirpes diferentes, foi determinado, como descrito por Hunter e Gaston (1998), utilizando o índice de discriminação de Simpson (SID) expresso como uma percentagem. O valor de SID obtido com a utilização de cada uma das enzimas em separado foi igual a 0,991. A combinação dos resultados obtidos com as duas enzimas originou 24 tipos PFGE combinados (pulsotipos) (Fig. 7) aumentando o poder discriminatório para 0,994.

Este valor confirma o elevado poder discriminante desta metodologia em *L. monocytogenes*. De facto, outros autores, utilizando este mesmo procedimento com isolados de *L. monocytogenes* de diferentes origens, encontraram valores de SID de 0,77 (Leite *et al.*, 2006), 0,94 (Felício *et al.*, 2007) e 0,97 (Neves *et al.*, 2008).

O elevado poder discriminante do método e o número elevado de pulsotipos gerado (24) a partir dos 26 isolados, mostra a elevada diversidade dos isolados em estudo. Este aspecto foi de importância fundamental quando a seguir se investigou o efeito da temperatura de refrigeração na virulência dos isolados. De facto, um estudo feito com um conjunto de estirpes geneticamente representativo da espécie permite uma melhor generalização dos resultados dos efeitos dos factores ambientais sobre essa mesma espécie.



**Figura 7** – Dendrograma utilizando o coeficiente de Dice e o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA) para 17 isolados de *Listeria monocytogenes* e para nove estirpes de referência, com base nos perfis de macrorestrição obtidos com as enzimas *AscI* e *ApaI*, respectivamente. Está indicada a linha de corte para as três linhagens genéticas de *L. monocytogenes* (I, II e III), bem como os grupos MPCR. As estirpes provenientes de coleções de cultura estão identificadas pela sua referência original: CECT – Colección Española de Cultivos Tipo; CIP – Collection de l'Institut Pasteur. Estão também indicadas as estirpes usadas como referência nos ensaios de virulência; EGDe e 442 (INRA - Institut National de la Recherche Agronomique).

Para um nível de semelhança próximo de 0,47, os isolados de *L. monocytogenes* foram divididos em três grupos, correspondentes às três linhagens genéticas (I, II e III) descritas para a espécie (Wiedmann *et al.*, 1997; Nightingale *et al.*, 2005) em que os 15 isolados dos grupos MPCR 1/2b-3b e 4b-4d-4e (11 isolados e 4 estirpes de referência) foram agrupados no grupo I. A exceção foi um dos isolados (4082) que, embora se encontre neste grupo, não pertence a esta linhagem, pois pertence ao grupo MPCR 1/2a-3a. O segundo grupo, de cinco isolados e três estirpes de referência, corresponde à linhagem II (grupos MPCR 1/2a-3a e 1/2c-3c). O terceiro grupo pertencente à linhagem III compreende duas estirpes de referência CECT 934 (serótipo 4a) e CIP 78.39 (serótipo 4c).

Esta subtipificação dos isolados foi feita de modo a garantir que a escolha dos isolados para o estudo do efeito da refrigeração na virulência inicial das estirpes se baseasse, por um lado, em estirpes de elevada diversidade genética e, por outro, no uso de estirpes das duas linhagens mais representativas (I e II) da espécie.

A linhagem I engloba, predominantemente, isolados provenientes de surtos humanos epidêmicos e esporádicos, relacionados com a transmissão alimentar e a linhagem II engloba preferencialmente isolados de alimentos (Wiedmann *et al.*, 1997).

### 3.2 O efeito do tempo de refrigeração a 7 °C na virulência de *L. monocytogenes*

Os 17 isolados de *L. monocytogenes* foram testados, em conjunto com as estirpes de referência usadas para os ensaios de virulência (EGDe como referência para estirpe virulenta e 442 como referência para estirpe pouco virulenta), através do ensaio de formação de placas de lise (*Plaque – Forming Assay – PFA*) em monocamadas da linha celular animal HT-29, antes e após os tempos de armazenagem (0, 1, 7 e 30 dias) à temperatura de refrigeração.

Neste grupo, incluíam-se isolados com as seguintes origens: alimentos congelados ( $n = 5$ ), alimentos refrigerados ( $n = 3$ ), alimentos refrigerados prontos a comer ( $n = 5$ ), alimentos prontos a comer ( $n = 1$ ), humanos ( $n = 2$ ) e ambiente de uma queijaria ( $n = 1$ ) (Quadro 1, Fig. 7).

Relativamente à serotipagem, a representação dos isolados de acordo com os respectivos grupos foi a seguinte: o grupo (4b-4d-4e) com 10 isolados, o grupo (1/2a-3a) com seis, o grupo (1/2b -3b-7) com dois, e o grupo (1/2c-3c) com um isolado (Fig. 7).

O potencial virulento das estirpes testadas foi expresso como a média dos logaritmos decimais (log) do número de placas formadas (PFA), em duplicado, em três ensaios independentes. A partir dos valores de log de PFA obtidos, foi realizada uma análise de variância, estirpe a estirpe, em que o factor considerado foi o tempo (Quadro 2).

Quadro 2 - Efeito do tempo de refrigeração a 7 °C na virulência de 19 isolados de *L. monocytogenes*

Na mesma linha diferentes letras apontam diferenças significativas entre médias ( $P < 0,05$ ).

EGDe - estirpe de referência para a virulência; 442 - estirpe de referência para a baixa virulência.

Tempo de refrigeração a 7 °C (dias)				
Referência dos isolados	0	1	7	30
Virulência (log PFA)				
EGDe	5,47 <sup>a</sup> ± 0,408	4,26 <sup>b</sup> ± 0,240	3,42 <sup>c</sup> ± 0,375	3,07 <sup>c</sup> ± 0,264
442	4,10 <sup>a</sup> ± 0,225	3,50 <sup>b</sup> ± 0,136	4,02 <sup>c</sup> ± 0,138	2,63 <sup>d</sup> ± 0,170
3046	3,00 <sup>a</sup> ± 0,386	2,13 <sup>b</sup> ± 0,223	2,10 <sup>b</sup> ± 0,053	2,07 <sup>b</sup> ± 0,111
3049	2,98 <sup>a</sup> ± 0,339	2,13 <sup>b</sup> ± 0,266	2,34 <sup>b</sup> ± 0,041	2,11 <sup>b</sup> ± 0,101
3077	6,13 <sup>a</sup> ± 0,097	5,43 <sup>b</sup> ± 0,195	4,68 <sup>c</sup> ± 0,355	4,90 <sup>c</sup> ± 0,089
3130	6,17 <sup>a</sup> ± 0,126	4,60 <sup>b</sup> ± 0,040	4,27 <sup>b</sup> ± 0,299	3,72 <sup>c</sup> ± 0,125
3172	6,31 <sup>a</sup> ± 0,033	5,45 <sup>b</sup> ± 0,102	5,05 <sup>b</sup> ± 0,358	4,90 <sup>b</sup> ± 0,291
3219	6,45 <sup>a</sup> ± 0,088	5,37 <sup>b</sup> ± 0,081	4,96 <sup>c</sup> ± 0,212	4,84 <sup>c</sup> ± 0,204
3850	6,24 <sup>a</sup> ± 0,166	4,92 <sup>b</sup> ± 0,187	4,71 <sup>b</sup> ± 0,075	4,58 <sup>b</sup> ± 0,131
3857	6,36 <sup>a</sup> ± 0,191	5,23 <sup>b</sup> ± 0,108	4,58 <sup>c</sup> ± 0,208	3,76 <sup>d</sup> ± 0,475
4003	5,64 <sup>a</sup> ± 0,256	3,86 <sup>b</sup> ± 0,357	2,98 <sup>c</sup> ± 0,396	2,49 <sup>c</sup> ± 0,395
4010	5,78 <sup>a</sup> ± 0,292	5,16 <sup>b</sup> ± 0,164	5,24 <sup>b</sup> ± 0,135	5,12 <sup>b</sup> ± 0,350
4011	5,96 <sup>a</sup> ± 0,128	4,46 <sup>b</sup> ± 0,090	3,75 <sup>c</sup> ± 0,296	4,86 <sup>d</sup> ± 0,324
4028	6,13 <sup>a</sup> ± 0,130	4,86 <sup>b</sup> ± 0,139	4,31 <sup>c</sup> ± 0,339	5,10 <sup>d</sup> ± 0,121
4032	6,07 <sup>a</sup> ± 0,063	5,03 <sup>b</sup> ± 0,170	4,64 <sup>b</sup> ± 0,297	5,08 <sup>b</sup> ± 0,195
4079	5,36 <sup>a</sup> ± 0,243	4,06 <sup>b</sup> ± 0,281	3,97 <sup>b</sup> ± 0,167	4,05 <sup>b</sup> ± 0,868
4082	5,82 <sup>a</sup> ± 0,546	3,92 <sup>b</sup> ± 0,250	3,93 <sup>b</sup> ± 0,069	3,83 <sup>b</sup> ± 0,613
4086	6,05 <sup>a</sup> ± 0,392	4,87 <sup>b</sup> ± 0,169	4,83 <sup>b</sup> ± 0,552	4,73 <sup>b</sup> ± 0,747
4089	4,18 <sup>a</sup> ± 0,438	2,40 <sup>b</sup> ± 0,106	1,77 <sup>b</sup> ± 0,042	1,47 <sup>b</sup> ± 0,362

Relativamente aos valores de virulência inicial, verificou-se que, além da estirpe 442 (referência para baixa virulência), também os isolados 3046 e 3049 (que correspondem a um mesmo pulsotipo, ver Fig.7) e a estirpe 4089 apresentavam valores de virulência significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) quando comparados com o valor correspondente à estirpe de referência para a virulência (EGDe). Todas as restantes estirpes usadas neste estudo foram consideradas potencialmente virulentas, ou seja a sua virulência inicial não era significativamente diferente ( $P > 0,05$ ) da virulência apresentada pela estirpe EGDe usada como referência para estirpe virulenta.

De salientar que a estirpe 442 apresentou um pulsotipo indistinguível do da estirpe 4010 (Fig. 7) e, no entanto, os seus níveis de virulência iniciais eram significativamente diferentes.

Relativamente ao estudo do efeito da temperatura de refrigeração sobre a virulência dos isolados, verificou-se uma diminuição significativa da virulência inicial de todos os isolados (Quadro 2), embora para 10 dos 19 isolados testados, o tempo não tenha tido um efeito significativo nesta perda de virulência. Com efeito, após o tratamento



a 7 °C durante 24 h, os isolados 3046, 3049, 3850, 3172, 4010, 4032, 4079, 4082, 4086 e 4089 apresentaram valores de virulência significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos iniciais. No entanto, não se observou variação significativa da virulência destas estirpes, após as 24 h e até aos 30 dias de refrigeração.

Em três isolados (3077, 3219, 4003) e na estirpe virulenta EGDe verificou-se uma diminuição significativa da virulência até aos 7 dias de refrigeração, mas a partir desse tempo a variação da virulência não foi significativa.

As estirpes 4011 e 4028 apresentaram uma redução significativa da virulência até aos 7 dias de refrigeração. Dos 7 para os 30 dias, ambas apresentaram um aumento significativo da virulência. No entanto, a virulência obtida ao fim de 30 dias de refrigeração continuou a ser significativamente inferior à virulência inicial ( $t = 0$ ).

A estirpe 442, aqui usada como referência para estirpes pouco virulentas, teve um comportamento diferente de todas as outras estirpes, ao fim do 1º dia de refrigeração, diminuiu significativamente a virulência. Do 1º para o 7º dia de refrigeração a sua virulência aumentou significativamente, e do 7º para o 30º dia a sua virulência voltou a diminuir significativamente. No entanto, apresentou sempre valores de virulência, após refrigeração, inferiores ao da virulência inicial.

A estirpe 3857 (de origem humana) foi a única estirpe testada que apresentou uma diminuição significativa da virulência ao longo do tempo.

Por último, a estirpe 3130 apresentou uma diminuição significativa da virulência ao fim do primeiro dia de refrigeração. Houve depois uma estabilização dos valores da virulência até ao 7º dia, e do 7º para o 30º dia de refrigeração voltou a ocorrer uma diminuição significativa da virulência.

Observou-se, assim, uma diminuição da virulência em relação à virulência inicial, em todas as estirpes utilizadas neste estudo. Essa diminuição foi observada, nalgumas estirpes, logo após 24 h de refrigeração. Nos outros tempos testados a tendência foi, também, para diminuir embora a dependência do tempo seja variável e pareça depender da estirpe em causa.

A informação relativa à relação entre a patogenicidade das estirpes e a refrigeração é muito escassa e a que existe é pouco recente. Em estudos anteriores, outros autores que, tal como neste trabalho, utilizaram suspensões bacterianas refrigeradas em soluções salinas isotónicas, mas desprovidas de nutrientes, obtiveram resultados idênticos, isto é, observaram uma diminuição da virulência, após a refrigeração das estirpes nestas condições (Buncic *et al.*, 1996; Avery e Buncic, 1997). No entanto estes autores utilizaram modelos animais, para avaliar este efeito.

Em 2001, Buncic *et al.* mantiveram as suspensões bacterianas refrigeradas a 4 °C, na ausência de nutrientes, e avaliaram o efeito da refrigeração sobre a virulência de

dois grupos de isolados pertencentes, respectivamente, aos serótipos 1/2a (linhagem II) e 4b (linhagem I). Concluíram estes autores que os isolados do serovar 4b, como grupo, tendiam a apresentar uma maior patogenicidade quando testados em embriões de galinha, quando comparados com os isolados do serovar 1/2a, cuja patogenicidade diminuía significativamente com a armazenagem no frio.

No nosso caso, embora se tenha observado um abaixamento geral da virulência das estirpes, após refrigeração (nas 19 estirpes testadas, de elevada diversidade genética, com diferentes origens e representativas das duas linhagens mais frequentes da espécie), verificou-se que, quando comparadas as virulências iniciais com as virulências após 30 dias de refrigeração a 7 °C, os abaixamentos nos valores das virulências iniciais superiores a 2 log de PFA ocorreram com seis isolados, sendo que cinco deles (EGDe, 3130, 4003, 4082 e 4089) pertenciam aos serovares 1/2a e 1/2c (linhagem II). Das estirpes testadas da linhagem II, apenas a estirpe de serovar 1/2a (isolados 3046 e 3049), de baixa virulência inicial, apresentou reduções dos valores de log de PFA menos acentuadas. No entanto, esta estirpe foi a que apresentou valores iniciais de log PFA mais baixos (Quadro 2).

Galdiero *et al.* (1997) utilizando a linha de células epiteliais, Caco-2, avaliaram o efeito da refrigeração sobre a invasibilidade de isolados de *L. monocytogenes* mantidos em alimentos refrigerados e concluíram que não houve alteração na invasibilidade, após 48 horas de incubação a 4 °C. Também Brackett e Beuchat (1990) e Myers e Martin (1994) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram a inoculação intraperitoneal de murganhos, como teste para avaliar a virulência dos isolados após refrigeração. (Czuprynski *et al.*, 1989; Stephens *et al.*, 1991) utilizando o teste de inoculação interaperitoneal de murganhos, relataram mesmo um aumento na virulência de *L. monocytogenes*, após crescimento a 4 °C. No entanto, nestes últimos relatos de manutenção ou mesmo de aumento de virulência, após sujeição dos isolados a temperaturas de refrigeração, os isolados encontravam-se em condições que permitiam o crescimento (alimento ou meio de cultura).

Os resultados aqui apresentados confirmam resultados anteriormente obtidos por outros autores utilizando outros modelos experimentais. A manutenção de estirpes virulentas de *L. monocytogenes* em matrizes alimentares refrigeradas, que impeçam o seu crescimento, poderá provocar uma diminuição significativa da sua virulência inicial e, conseqüentemente, uma diminuição do risco para a saúde do consumidor.

## 4. Conclusões

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica de origem alimentar capaz de provocar graves surtos de listeriose, particularmente entre indivíduos cujo sistema imunitário se encontra pouco desenvolvido (crianças) ou debilitado (idosos, grávidas e outros imunocomprometidos).

Neste trabalho, utilizaram-se 17 isolados e nove estirpes de referência que foram caracterizados por PFGE. Os resultados da análise por PFGE mostraram a elevada diversidade genética destes isolados representativos das duas principais linhagens genéticas desta espécie. Dos 17 isolados, cinco foram recolhidos de alimentos congelados, três de alimentos refrigerados, cinco de alimentos prontos a comer (RTE) refrigerados, um de um alimento RTE, dois de humanos e um do ambiente de uma queijaria.

A virulência destes 17 isolados e de duas estirpes de referência para a virulência foi avaliada, na ausência de crescimento, antes e após 1, 7 e 30 dias de armazenagem a uma temperatura de refrigeração (7 °C). Os resultados aqui apresentados mostraram um abaixamento generalizado da virulência, após refrigeração, embora o tempo não tenha tido um efeito significativo na maioria dos isolados (10 em 19).

Embora a refrigeração de alimentos seja um processo cada vez mais utilizado pela indústria alimentar, existem poucos estudos relativos ao efeito das temperaturas de refrigeração sobre a virulência de *L. monocytogenes*. Os resultados aqui obtidos sugerem que o facto de o alimento poder permitir, ou não, o crescimento deste patógeno alimentar, poderá ser relevante em termos do potencial patogénico de *Listeria* presente nos alimentos.

De facto, resultados de um trabalho produzido anteriormente no nosso grupo mostraram que um tipo de queijo Português feito com leite cru de ovelha tinha potencial para suportar a sobrevivência de *L. monocytogenes*, mas não o seu crescimento (Gameiro *et al.*, 2007). Alguns dos isolados analisados neste trabalho (3077, 3130 e 3219) foram recolhidos deste tipo de queijo e do ambiente de uma queijaria (3172) (Leite *et al.*, 2006). A diminuição da virulência destas estirpes sujeitas à rede de frio, durante os processos de cura dos queijos, armazenamento, distribuição e na casa do consumidor, poderia ser uma possível explicação para o facto de não se conhecerem casos de listeriose associados ao consumo deste tipo de queijo. No entanto, o facto da listeriose ainda não ser de notificação obrigatória em Portugal pode mascarar estas observações.

Em termos de avaliação do risco representado pela presença de *L. monocytogenes* em alimentos sujeitos ao frio, os alimentos que sustentam o crescimento

deste patogénio devem constituir o principal objectivo da gestão de risco associado à presença desta bactéria patogénica.

## 5. Bibliografia

Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, P. D., Projan, S. J., Dunman, P. M. 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their affects on log-phase mRNA turnover. *Journal of Bacteriology*, **188** (19): 6739-6756.

Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labela, D. P., and Wilkinson, B. J. 1997. Critical role of anteiso-C<sub>15:0</sub> fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (10): 3887-3894.

Anónimo. 2007. Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, *Jornal Oficial da Comunidade Europeia*, L 322/12-29.

Anónimo 2005. ILSI Research Foundation / Risk Science Institute Expert Panel on *Listeria monocytogenes* in foods. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis-a risk-based approach. *Journal of Food Protection*, **68** (9): 1932-1994.

Anónimo. 2003. U. S. Department of Health and Human Services / U. S. Department of Agriculture. 2003. Quantitive assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eatfoods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>. Consultado em Março 2009.

Audurier, A., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F.1980. Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*. *Annales de Microbiologie de l'Institute Pasteur*, **131B**: 47-57.

Avery, S. M., Buncic S. 1997. Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37 °C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, **34**: 319-327.

Bayles, D. O., and Wilkinson B. J., 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 23-27.

Bayles, D. O., Annous, B. A., Wilkinson, B. J. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (3): 1116-1119.

Benedict, R. 1990. Foodborne Listeriosis. Ed. Miller, A., Smith, J. & Somkutti, G. Society for Industrial Microbiology. *Elsevier*. Amsterdam. 13-24.

Bhunja, A.K., Steele, P.J., Westbrook, D.G., Bly, L.A., Maloney, T.P., Johnson, M.G. 1994. A six hour *in vitro* virulence assay for *Listeria monocytogenes* using myeloma and hybridoma cells from murine and human sources. *Microbiology Pathogenesis*. **16**: 99-110.

Borucki M. K., Call D. R. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 5537-5540.

Brackett R., Beuchat L. 1990. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* grown on crabmeat. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1216-1220.

Brito L., 2003. Listeria, listeriose, histeria e neurose. *Ingenium*, 2ª série, nº **78**: 66-69.

Brito L., 2008. Protocolo da disciplina Métodos Moleculares de Diagnóstico, ISA, UTL.

Broomer, C. V., Ciesielski, C.A., Linnan, M.J., Hightower, A. W. 1986. Listeriosis in the United States. *Journal of Food Protection*, **49**: 848.

Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, C., Vindel, E. Rocourt, J. 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *Journal of Food Protection*, **56**: 296-301.

Brosch, R., Chen, J., Luchansky, J.B. 1994. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2584-2592.

Bubert, A., kohler, S., Goebel, W. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species- specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2625-2632.

Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Vülker, U., Bremer, E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*, **152** (3): 831-853.

Buncic S., Avery S. M. 1996. Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37 °C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 °C. *Letters in Applied Microbiology*, **23**: 18-22.

Cabrita, P., Correia, S., Ferreira-Dias, S., Brito, L. 2004. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 454-461.

CDC – Centers of Disease Control and Prevention. Georgia. PulseNet Protocols. 999–1007. Disponível: <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm> Consultado em Setembro 2009.

Chambel L., Sol M., Fernandes I., Barbosa M., Zilhão I., Barata B., Jordan S., Perni S., Shama G., Adrião A., Faleiro L., Requena T., Peláez C., Andrew P. W., Tenreiro R. 2007. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. In the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, **116**: 52-63.

Concepción Cabeza M., Cambero I., de la Hoz Juan L, Ordóñez A. 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8**: 299-305.

Conner, D. E., Scott, V.N., Summer, S.S. Bernard, D.T. 1989. Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Food Science*, **54**: 1553-1556.

Cossart, P. 1995. Actin-based bacterial mobility. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**: 94-101.

Czuprynski, C., Brown, J., Roll, J. (1989). Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *Microbial Pathogenesis*, **7** (3): 213-223.

- Dalton, C., Austin, C., Sobel, J., Hayes, P., Bibb, W., Graves, L., Swaminathan, B., Proctor, M., Griffin, P., 1997. An out break of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*, **336**: 100-105.
- Daneshvar, M. I., J. B. Brooks, G. B. Malcolm, Pine L. 1989. Analysis of fermentation products of *Listeria* species by frequency – pulsed electron – capture gas-liquid chromatography. *Canadian Journal Microbiology*, **35**: 786-793.
- de Valk, H., Vaillant, V. Jacquet, C., Rocourt, J., Le Querrec, F., Stainer, F., Quelquejeu, N., Pierre, O., Pierre V., Desenclos, J. C., Goulet, V. 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October1999-February 2000. *American Journal of Epidemiology*, **154** (10): 944-950.
- Donald E. Conner, Virginia N. Scott, Susan S. Summer, Dane T. Bernard.1989. Pathogenicity of Foodborne, Environmental and Clinical Isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Food Science*, **54** (6):1553-1556.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 3819-3822.
- Doyle M. E., Ph.D. 2001. FRI Briefings : Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Research Institute*, University of Wisconsin-Madison 1-13.
- Drams, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology*, **16**: 251-261.
- Dubail, I., Autret, N., Beretti, J.L., Kayal, S., Berche, P., Charbit, A. 2001. Functional assembly of two membrane-binding domains in listeriolysin O, the cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, **147**: 2679-2688.
- Farber, J.M. Addison, C.J. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *Journal International of Applied Bacteriology*, **77**: 242-250.
- Farber, J.M. Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiological Reviews*, **55**: 476-511.



Farber, J.M. Peterkin, P.I. 2000. *Listeria monocytogenes*. *The Microbiological Safety and Quality of Food*, **II**: 1178-1232.

Farber, J.M., Ross, W.H. e Harwig, J. 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal Food Microbiology*, **30**: 145-156.

Farber, J.M., Speirs, J.I. 1987. Potencial use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. *Journal Clinical Microbiology*, **25**: 1463-1466.

Felicio M. T. S., Hohh T., Gibbs P., Teixeira P., Wiedmann M. 2007. Recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* contamination in Alheiras represents Considerable diversity, including virulence attenuated isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (12): 3887-3895.

Fenlon, D. R. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment, In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Pp. 21-38. E. T. Ryser and E. H. Marth, Eds., A., Marcel Dekker, Inc., New York.

Ferreira, A., O'Byrne, C. P., Boor, K. J. (2001). Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, **67**: 4454-4457.

Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C. P., Boor, K. J. (2003). Role of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, **69**: 2692-2698.

Fleming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum, J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M.B., Audurier A., Broome C.V., Reingold A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine*, **312**: 404-407.

Gahan, C., Collins, J. 1991. Listeriosis: biology and implications for the food industry, *Trends in Food Science and Technology*, **4**.

Gaillard JL, Berche P., Frehel C., Gouin E., Cossart P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, **65**: 1127-1141.

Galdiero E., D'Isanto M., Aliberti, F. (1997). Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Research Microbiology*, **148**: 305-313.

Gameiro N., Dias S. F., Ferreira M., Ferreira M. A. S. S., Brito L. 2007. Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese. *Food Control*, **18**: 1258-1262.

Gedde, M. M., D.E. Higgins, L.G. Tilney and D.A. Portnoy. 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, **68**: 999-1003.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Beeche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez- Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Haf, F., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez- Diaz, J. C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vasquez- Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. 2001. Comparative genomic of *Listeria* species. *Science*, **294** (5543): 849-852.

Gopal S., Berg D., Hagen N., Schrieffer E. M., Stoll R., Goebel W., Kreft J. 2010. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoSone*, **5** (4) e 10349-e10371.

Graumann, P. L., Marahiel, M. A. 2000. Cold shock response and adaptation pp. 27-40. Inouye, M. and Yamanaka, K., Eds. Horizon Scientific, Wymondham.

Graves, L.M., Swaminathan, B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, **65**: 55-62.

Gray, M., Freitag, N., Boor, K. 2006. How bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jeckyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Immunity*, **74** (5): 2505-2512.

Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., Brors, B., Haas, S., Kuenne, C.T., Billion, A., Otten, S., Pane-Farre, J., Engelmann, S., Chakraborty, T. (2008). Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e sigmaB. *BMC Microbiology*, **8**: 20.

- Hamon M., Bierne H. Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, **4**: 423-434.
- Ho J.L., Shands, K.N., Friedland G., Eckind P., Fraser D. W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of International Medicine*, **146**: 520-524.
- Hof H., Nichterlein T., Kretschmar, M. 1994. When are *Listeria* in foods a health risk? *Trends in food Science and Technology*, **5**: 185-190.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing schemes: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**: 2465-2466.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, *Cell*. **110** (5): 551-561.
- Kaan, T., Homuth, G., Mader, U., Bandow, J., Schweder, T. 2002. Genome wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology*, **148** (11): 3441-3455.
- Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., Boor, K. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**: 527-543.
- Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O., Cossart P. 2006. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Third edition, Springer, Volume **4**, 404-476.
- Kerr, K.G., Kite ,P., Heritage, J., Hawkey, P.M. 1995. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Food Protection*, **58**: 609-613.
- Larson, A. E., E. A. Johnson, J. H. Nelson. 1999. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal Dairy Science*, **82**: 1860-1968.

- Leite P., Rodrigues R., Ferreira M., Ribeiro G., Jacquet C., Martin P., Brito L. 2006. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, **106**: 111-121.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobiol Agents Chemotheraty*, **45** (4): 999–1007.
- Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, **55**: 645-659.
- Liu D., Lawrence M. L., Ainsworth A. J., Austin F. W. 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *International Jornal of Food Microbiology*, **118**: 101-115.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, **9** (1), 34-39.
- Mainou-Fowler, T., MacGowan, A.P., Postlethwaite, R., 1988. Virulence of *Listeria* spp.: course of infection in resistant and susceptible mice. *Journal of Medical Microbiology*, **27**: 131-140.
- Mandin, P., Fsihi, H., Dussurget, O., Vergassola, M., Milohanic, E., Toledo-Arana, A., Lasa, I., Johansson, J., Cossart, P. (2005). VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **57**: 1367-1380.
- Martin, P., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., De Valk, H. 2006. Pulse-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe feasibility study, *Foodborne Pathogens and Disease*, **3**: 3003-3308.
- McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, **92**: 15-33.
- McLauchlin, J. 1987. A review – *Listeria monocytogenes*: Recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of Applied Bacteriology*, **63**: 1-11.

- McLauchlin, J., Audurier, A., Frommelt, A., Gerner-Smidt, P., Jacquet, C., Loessner, M., Van der Mee-Marquet, N., Rocourt, J., Shah, S., Wilhelms, D. 1996. WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *International Journal of Food Microbiology*, **32**: 289-299.
- Moorhead, S. M., Dykes, G. A. (2004). Influence of the *sigB* gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *International Journal of Food Microbiology*, **91**: 63-72.
- Myers, E., Martin S. 1994. Virulence of *Listeria monocytogenes* propagated in NaCl containing media at 4, 25 and 37 °C. *Journal of Food Protection*, **57**: 475-478.
- Nedwell, D. B. Rutter, M. 1994. Influence of temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (6): 1984-1992.
- Nelson, K. E., Fouts, D. E., Mongodin, E. F. 30 outros autores. 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Research*, **32**: 2386-2395.
- Neves E., Lourenço A., Silva A. C., Coutinho R, Brito L. 2008. Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars associated with molecular serotyping. *Systematic and Applied Microbiology*, **31**: 387-392.
- Neves E., Silva A. C., Roche S. M., Velge P., Brito L. 2008. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. *Journal of Medical Microbiology*, **57**: 411-415.
- Nightingale, K.K., Windham, K., Wiedmann, M. 2005. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *Journal of Bacteriology*, **187**: 5537-5551.
- Nolan, D. A., Chamblin D. C., Troller J. A. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, **16**: 323-335.

Phan-Thanh, L. Gormon, T. 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* by two dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **16** (3): 444-450.

Pine L., Malcolm G. B., Brooks J. B., Daneshvar M. I. 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, **35**: 245-254.

Portnoy, D.A., Jacks, M.S., Hinrichs D.J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, **167**: 1459-1471.

Priest, F. Austin, B. 1993. Modern Bacterial Taxonomy, second ed. Chapman and Hall. London.

Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K. 2008. Comparative Analysis of the  $\sigma^B$ - dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 158-171.

Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J. S., Lekshmi M. U., Dharsana K.S., Prasad S. P., Vijila H. M. 2007. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, **40**: 4-13.

Roche S. M., Gracieux P., Velge P. 2009. Poor detection of low-virulence field strains of *L. monocytogenes* is related to selective agents in selective media and is unrelated to PrfA. *Food Microbiology*, **26**: 21-26.

Roche, S., Velge, P. Liu, D. (2008). Virulence determination. In: Liu, D.(Eds.), Handbook of *Listeria monocytogenes* (pp. 241). USA: CRC Press.

Roche S. M., Gracieux P., Albert I., Gouali M., Jacquet C., Martin P. M. V. and Velge P. 2003. Experimental Validation of Low Virulence in Field Strains of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, June: 3429-3436.

Roche, S.M., Velge, P., Bottreau, E., Durier, C., Marquet-van der Mee, N., Pardon, P., 2001. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *International Journal of Food Microbiology*, **68**: 33–44.

Rocourt, J., Cossart, P., 1997. *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers. Ed: Doyle, M.P., Beauchat, L.R. Montville, T.J., American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, 337-352.

Ryser E. T. and Marth E. H. 2007. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Third edition, CRC Press, Volume **9**, 283-299.

Ryser E. T. Marth E. H.. 1991. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Marcel Deekker Inc, Volume **1**, 1-16.

Salamina, GT., Donne, ED., Niccolini, A. e outros autores. 1996. A food-borne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology Infection*, **117**: 429-436.

Schmid B., Klumpp J., Raimann E., Loessner M. J., Stephan R., Tasara T. 2009. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Applied Environmental Microbiology*, **75**: 1621-1627.

Seeliger, H. P. R., Jones D. 1987. *Listeria*. In J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9 th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1245.

Schuchat, A., Deaver K.A., Wenger J.D., Plikaytis B.D., Mascola L., Pinner R.W., Reingold A.L., Broome C.V., e o *Listeria* Study Group. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis .I. Case control study of dietary risk factors. *Journal of American Medicine Association*, **267**: 2041-2045.

Stephens, J., Roberts, I., Jones D., Andrew, P. 1991. Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence, *Journal of Applied Bacteriology*, **70**: 239-244.

Stelma, G.N., Reyes, A.L., Peter, J.T. e outros autores 1987. Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**: 2085-2089.

Suutari, M. Laakso, S. 1994. Microbiol fatty and thermal adaptation. *Critical Review Microbiology*, **20** (4): 285-328.

Swaminathan, B., Rocourt, J., Bille, J. 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Yolken, R., ASM Press, Washington D.C.: 341-348.

Tabouret, M., De Rycke, J., Audurier A. Poutrel, B. 1991. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. *Journal of Medical Microbiology*, **34**: 13-18.

Thieringer, H. A., Jones, P. G., Inouye, M. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioassays*, **20**(6): 1437-1484.

Tienungoon, S., D. A. Ratkowsky, T. A. McMeekin, T. Ross. 2000. Groth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 4979-4987.

Vazquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** (3): 584-640.

Velge, P., Bottreau, E., Van Langendonck, N., Kaeffer, B. 1997. Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. *Journal of Medical Microbiology*, **46**: 681-692.

Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S., 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 430-441.

Warrier K. Namvar A. 2009. What is the hysteria with Listeria? *Trends in Food Science & Technology*, **20**: 245-254.

Wemekamp-Kamphuis, H. H., Wouters, J. A., Leeuw, P. P. L. A., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T. 2004. Identification of Sigma factor  $\sigma^b$ -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3457-3466.



- Wernars, K., Boerlin, P., Audurier, A., Russel, E., Curtis, G., Herman, L., Van der Meer, N. 1996. The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *International Journal of Food Microbiology*, **32**: 325-341.
- Wernars, K., Heuvelman, K., Notermans S., Domann, E., Leimeisterwachter, M. and Chakraborty, T. 1992. Suitability of the *prfA* gene which encodes a regulator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 765-768.
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., Boor, K. J. 1998. General stress transcription factor  $\sigma^B$  and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Bacteriology*, **180**: 3650-3656.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L., Batt, C.A. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, **65**: 2707-2716.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Abee, T. 2000. The role of cold-shock proteins in low temperature adaptation of food related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **23** (2): 165-173.
- Yancey, P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**:1214-1222.
- Zhang W., Knabel S. J. 2005. Multiplex PCR assay simplifies serotyping and sequence typing of *Listeria monocytogenes* associated with human outbreaks. *Journal of Food Protection*, **68**: 1907-1910.
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Duusaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., J.L., Rousset, M. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cell Physiology*, **122**: 21-29.